

Quantitative Analyse der Bewegungsdynamik des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* in viskoelastischen Medien

Von der Universität Bayreuth
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

von

Carsten Schade

aus Marktredwitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiß
2. Gutachter: Prof. Dr. Holger Kreß

Tag der Einreichung: 16.10.2017

Tag des Kolloquiums: 19.03.2018

Zusammenfassung

Caenorhabditis elegans gehören zum Stamm der Nematoden (Fadenwürmer) und können eine Körperlänge von über 1 mm erreichen. Ihre Fortbewegung ist komplex und hängt von den viskoelastischen Eigenschaften ihrer näheren Umgebung ab. Für eine quantitative Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* wurde extra für diese Arbeit ein spezielles Durchlichtmikroskop gebaut, mit dem die Fortbewegung der Nematoden in unterschiedlich viskoelastischen Umgebungen optimal untersucht werden konnte. Als viskoelastische Umgebungen wurden dabei Agarose-Lösungen aus M9-Puffer mit Agarose-Anteilen zwischen 0 und 0,5 Gew.-% verwendet. Mit einer Kombination aus Matlab und LabVIEW wurde eigens für das Mikroskop ein neues Software-Konzept für die Programmierung von Tracking-Systemen entwickelt, das es uns ermöglichte, eine präzise Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* durchzuführen. Durch den Einsatz verschiedener Aufnahme-Verfahren konnten die Nematoden sowohl mit Tracking-Geschwindigkeiten bis zu 30 Bildern pro Sekunde aufgenommen, als auch ihre Fortbewegung über längere Strecken (bis in den Zentimeterbereich hinein) beobachtet werden. Damit konnten wir zeigen, dass es bei Agarose-Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,4 Gew.-% einen optimal viskoelastischen Bereich für die Fortbewegung der Nematoden gibt, in welchem sich die Nematoden am effizientesten fortbewegen können. Darüber hinaus zeigte sich, dass für lange Beobachtungszeiten (>25 Sekunden) die Bewegung der Nematoden in allen viskoelastischen Umgebungen superdiffusiv ist. Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse konnte mit einer Kombination aus Random walk und periodischem Bewegungszyklus ein neues Modell der *C. elegans*-Bewegung erstellt werden, mit dem die Fortbewegung der Nematoden in viskoelastischen Umgebungen auf allen Zeitskalen exakt beschrieben werden kann.

Abstract

Caenorhabditis elegans belong to the strain of the nematodes (roundworms) and can reach a body length of more than 1 mm. Their locomotion is complex and depends on the viscoelastic properties of their surrounding. For a quantitative analysis of the movement dynamics of *C. elegans*, a special transmission light microscope was specially constructed for this work, which could optimally investigate the locomotion of the nematodes in different viscoelastic environments. Agarose solutions from M9 buffers with agarose portions between 0 and 0.5% by weight were used as viscoelastic environments. With a combination of Matlab and LabVIEW, a new software concept for the programming of tracking systems was developed specially for the microscope that allowed us to carry out a precise analysis of the movement dynamics of *C. elegans*. Using different recording methods, the nematodes could be monitored with tracking speeds of up to 30 images per second, even large-scale movement in the centimeter range. We were thus able to show that with agarose concentrations between 0.3 and 0.4% by weight, there is an optimal viscoelastic range for the movement of the nematodes in which the nematodes can move most efficiently. Furthermore, for long observation times (>25 seconds) the movement of the nematodes is superdiffusive in all viscoelastic environments. On the basis of the results obtained, a new model of the *C. elegans* movement could be re-created with a combination of random walk and periodic movement cycle, with which the movement of the nematodes in viscoelastic environments can be accurately described on all time scales.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
2	Grundlagen	8
2.1	Explorationsstrategien (in)aktiver Teilchen	8
2.2	Der Fadenwurm <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	11
2.2.1	Ein Kurzportrait von <i>C. elegans</i>	11
2.2.2	Entwicklungszyklen von <i>C. elegans</i>	13
2.2.3	Bewegungsdynamik von <i>C. elegans</i>	14
2.3	Problemstellung der vorliegenden Arbeit	16
3	Probenpräparation und experimenteller Aufbau	17
3.1	Kultivierung von <i>C. elegans</i>	17
3.2	Experimenteller Aufbau des Wurmtrackers.....	21
3.3	Kalibrierung und Einrichtung des Wurmtrackers	23
3.4	Diskussion	30
4	Software zur Datenakquise und -analyse	32
4.1	Ansteuerung des Wurmtrackers und Aufnahmekonzepte	32
4.2	Qualitätskontrolle und Segmentierung nach der Aufnahme	56
4.3	Analyse der Daten und ermittelte Größen	74
4.4	Diskussion	91
5	Experimentelle Resultate und Diskussion	94
5.1	Messparameter und Kennzahlen der verwendeten Aufnahme-Verfahren	94
5.2	Analyse der Bahnkurven.....	96
5.2.1	Verschiebung der Mittelpunkte	96
5.2.2	Anomalie der Bewegung	100
5.2.3	Mean first passage time	104
5.2.4	Mittlere Wegeffizienz	108
5.3	Analyse der Körperform	112
5.4	Diskussion	118

6	Modellbildung und Diskussion	122
6.1	Aufbau und die einzelnen Komponenten des Modells	122
6.2	Auswertung und Ergebnisse der simulierten Tracking-Sequenzen.....	128
6.3	Richtungsänderung der Nematoden während ihrer Fortbewegung.....	132
6.4	Diskussion.....	135
7	Zusammenfassung und Ausblick	137
7.1	Vorteile des verwendeten Software-Konzepts	137
7.2	Vor- und Nachteile der verwendeten Aufnahme-Verfahren	137
7.3	Zusammenfassung der quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik.....	138
7.4	Ausblick.....	139
	Literaturverzeichnis.....	141
	Anhang	145
	technische Daten.....	145
	Kamera	145
	optischer Aufbau	147
	Stage.....	148
	Lichtquelle	150
	Verteilungen für die Simulation	151
	Messprotokolle des komplexen Schubmoduls.....	153
	Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeiten	159
	Matlab-Skripte.....	161
	Aufnahme-Verfahren I.....	161
	Aufnahme-Verfahren II.....	164
	Aufnahme-Verfahren III.....	167
	Blockschaltbilder	174
	Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren I.....	174
	Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren II.....	175
	Blockschaltbild der Qualitätskontrolle	176
	Blockschaltbild der Segmentierung.....	177
	Blockschaltbild für die Bestimmung der absoluten Nematoden-Position	178
	Blockschaltbild des Programms zur Bewegungskontrolle.....	179
	Eidesstattliche Versicherung	181

1 Einleitung

In der Natur besitzen viele Lebewesen die Fähigkeit, sich aus eigener Kraft fortzubewegen. Da sich die Organismen in den unterschiedlichsten Umgebungen (Wasser, Land, Luft) fortbewegen, haben sich im Laufe der Zeit die verschiedensten Formen der Fortbewegung entwickelt (z. B. Kriechen, Schwimmen, Laufen und Fliegen). Im Allgemeinen wird bei der Fortbewegung von Lebewesen zwischen aktiver und passiver Bewegung unterschieden. Bei einer passiven Bewegung lässt sich der Organismus von seiner Umgebung transportieren, d. h. die Fortbewegung erfolgt ohne Eigenleistung. Unter einer aktiven Bewegung versteht man hingegen eine Bewegung, die von dem Organismus unter Energieaufwand selbst erbracht wird. Dafür muss der Organismus mit Gliedmaßen (Beine, Flügel, Flossen, ...) oder anderen anatomischen Teilen chemische Energie in mechanische Energie umwandeln. Ein Beispiel für einen lebenden Organismus, der sich aktiv in verschiedenen Umgebungen fortbewegt, ist der Nematode *Caenorhabditis elegans* (siehe Abbildung 1).

Caenorhabditis elegans sind transparente Nematoden (Fadenwürmer), die weltweit in gemäßigten Klimazonen vorkommen. Sie leben überwiegend in vermoderndem pflanzlichen Material, da sich ihre bakterielle Nahrung hauptsächlich an diesen Stellen befindet (Barrière & Félix, 2014). Im Labor werden die Nematoden auf speziellen Agarplatten gezüchtet, die mit einer dünnen Schicht aus Bakterien (typischerweise *Escherichia coli*) überzogen sind. Bei der Aufzucht ist es wichtig, dass die Tiere immer genügend Futter zur Verfügung haben, andernfalls stoppt ihre Entwicklung im Larvenstadium. Ausgewachsene Exemplare erreichen eine Länge von über 1 mm und einen Durchmesser von zirka 65 µm. Von *C. elegans* existieren zwei Geschlechter, zum einen selbstbefruchtende Hermaphroditen und mit einer Häufigkeit von 0,1 - 0,2 % Männchen. Eine Besonderheit von *C. elegans* ist die invariante Anzahl an somatischen Zellen, wodurch es möglich wurde, die Entwicklung jeder einzelnen Zelle von der Befruchtung bis ins Erwachsenenstadium nachzuverfolgen und eine vollständige Zelllinie zu generieren (Sulston & Horvitz, 1977), (Kimble & Hirsh, 1979), (Sulston, Albertson, & Thomson, 1980). *C. elegans* war auch der erste eukaryotische Mehrzeller, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).



Abbildung 1: Der Fadenwurm *C. elegans* kann eine Länge von über 1 mm und einen Durchmesser von 65 µm erreichen. Die Aufnahme zeigt zwei ausgewachsene Hermaphroditen, die sich in einer Dextran-Lösung fortbewegen. Gemacht wurde die Aufnahme im Labor mit einem Leica DMI4000 B Lichtmikroskop (eigene Aufnahme).

2 Grundlagen

Das Erforschen der Umgebung zum Auffinden von lebensnotwendigen Ressourcen wie Nahrung oder möglichen Partnern zur Fortpflanzung ist eine elementare Aufgabe lebender Organismen. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, müssen sich die Lebewesen fortbewegen. Bei der Fortbewegung von lebenden Organismen wird zwischen aktiver und passiver Bewegung unterschieden. Die aktive Fortbewegung ist eine Vorwärtsbewegung aus eigener Kraft, die durch Gliedmaßen (Beine, Flügel, Flossen, ...) oder anderen anatomischen Teilen des Organismus ermöglicht wird. Bei einer passiven Fortbewegung hingegen lässt sich der Organismus von seiner Umgebung transportieren (bspw. das Segeln der Portugiesischen Galeere auf der Meeresoberfläche). Im Allgemeinen bezeichnet man mit der Bewegung eines Objekts die Änderung seiner räumlichen Position in Abhängigkeit der Zeit. Mit Bahnkurven (Trajektorien) lässt sich die Bewegung eines Objekts mathematisch beschreiben. Die Bahnkurve eines Objekts beinhaltet alle Positionen (repräsentiert durch Ortsvektoren), an denen sich das Objekt während des Beobachtungszeitraums befunden hat (siehe Abbildung 2). Im Experiment ist die Bahnkurve eines Objekts auch abhängig von der Zeitauflösung der Messung.

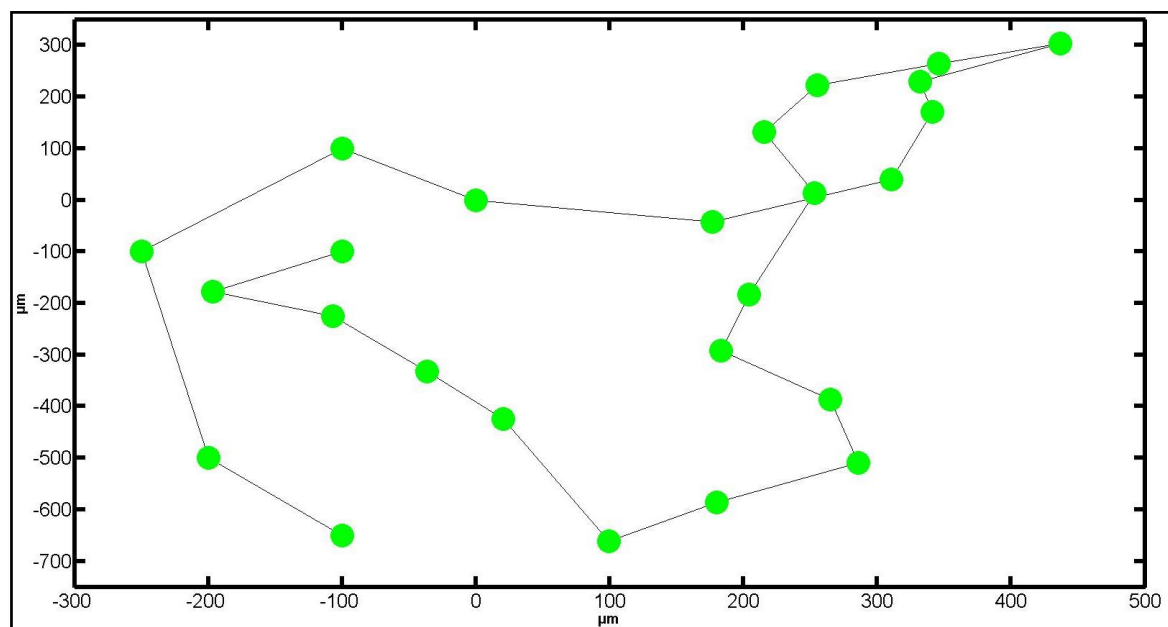


Abbildung 2: Bahnkurve eines sich bewegenden Objekts. In der obigen Abbildung ist die (simulierte) Bahnkurve eines Nematoden zu sehen, der sich in reinem M9-Puffer fortbewegt. Die grünen Punkte repräsentieren die Positionen der Mittelpunkte des Nematoden zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Mittelpunkten beträgt in etwa 1 Sekunde.

2.1 Explorationsstrategien (in)aktiver Teilchen

Die Bahnkurven von lebenden Organismen, die sich aktiv fortbewegen, gleichen üblicherweise den Bahnkurven von reinen Zufallsbewegungen (Codling, Plank, & Benhamou, 2008). Eine Zufallsbewegung (Random walk) ist wiederum eine mathematische Beschreibung für die Fortbewegung eines Objekts, bei der die einzelnen Schritte seiner Bewegung rein zufällig und unabhängig voneinander erfolgen. Ein Beispiel für eine Zufallsbewegung ist die Brownsche Bewegung.

Brownsche Bewegung:

Die Brownsche Bewegung beschreibt die unregelmäßige und ruckartige Bewegung von Partikeln in Flüssigkeiten und Gasen. Der Grund für diese Zufallsbewegung der Partikel ist, dass die Moleküle der Flüssigkeit (bzw. des Gases) aufgrund ihrer ungeordneten Wärmebewegung ständig und aus allen Richtungen in großer Zahl gegen die Partikel stoßen. Bei diesen Stößen werden die Partikel rein zufällig in eine beliebige Richtung abgelenkt. Die Brownsche Bewegung eines Teilchens lässt sich mit einer Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x,t)$ beschreiben, wobei x der Abstand des Teilchens von seinem Startpunkt $x_0 = 0$ zum Zeitpunkt t ist. Im Folgenden wird der einfachste Fall einer eindimensionalen Brownschen Bewegung betrachtet, bei der sich das Partikel entlang der x -Achse bewegt. Bei jedem Zeitschritt dt springt das Teilchen um eine zufällige Länge δ nach vorne oder hinten (positive bzw. negative x -Richtung). Dabei springt das Teilchen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit (p) in jede der beiden möglichen Richtungen. In diesem Fall wird die Wahrscheinlichkeit, dass nach n Zeitschritten genau k Sprünge in positiver x -Richtung erfolgt sind, durch die Binomialverteilung beschrieben (siehe Abbildung 3).

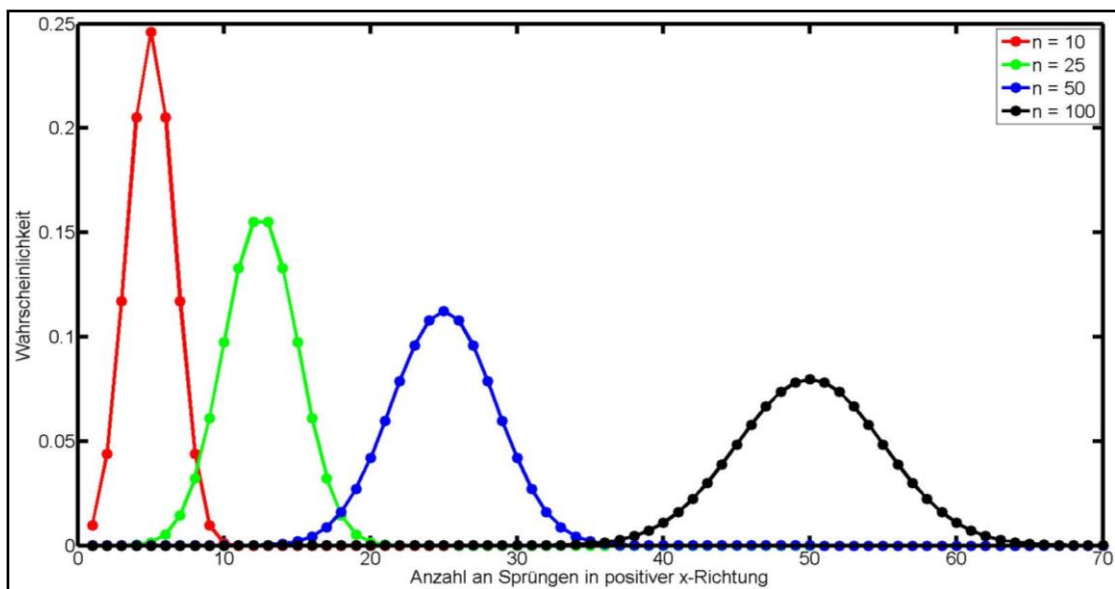


Abbildung 3: Die Binomialverteilung gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass nach n Zeitschritten das Teilchen genau k Sprünge in positiver x -Richtung gemacht hat. In der obigen Abbildung sind die Binomialverteilungen für $p = 0,5$ und $n = 10$ (rot), $n = 25$ (grün), $n = 50$ (blau) und $n = 100$ (schwarz) eingezeichnet. Nach dem Satz von Moivre-Laplace konvergiert für $n \rightarrow \infty$ und $0 < p < 1$ die Binomialverteilung gegen die Normalverteilung. (Dass sich mit wachsendem n die Form der Binomialverteilung einer Gaußverteilung immer weiter annähert, kann bereits in der obigen Abbildung gut erkannt werden.)

Nach dem Satz von Moivre-Laplace konvergiert für eine große Anzahl an Zeitschritten n und einer Wahrscheinlichkeit $0 < p < 1$ die Binomialverteilung gegen eine Gauß- bzw. Normalverteilung. Daher hat die Wahrscheinlichkeitsverteilung P einer d -dimensionalen Brownschen Bewegung des Partikels die Form:

$$P(x,t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|x|^2}{4Dt}} \quad (1)$$

, wobei d die Anzahl an Dimensionen ist, in denen sich das Partikel frei bewegen kann. D wird als Diffusionskoeffizient bezeichnet und ist abhängig von dem Partikel selbst und dem Medium, in dem der Partikel diffundiert. $P(x,t)$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit des diffundierenden Partikels, nach der Zeit t den Abstand x vom Startpunkt der Bewegung x_0 zu besitzen.

Das erste Moment einer Wahrscheinlichkeitsverteilung ist der Erwartungswert. Damit ergibt sich für das erste Moment der obigen Verteilung $P(x,t)$:

$$\langle x \rangle = 0 \quad (2)$$

Das zweite Moment der Verteilung $P(x,t)$ ist die Varianz bzw. die mittlere quadratische Verschiebung des Partikels:

$$\langle x^2 \rangle = 2dDt \quad (3)$$

Noch höhere Momente einer Gaußverteilung sind Funktionen des ersten und zweiten Moments und beinhalten daher keine zusätzlichen Informationen mehr. Aus dem zeitlichen Verlauf der mittleren quadratischen Verschiebung des Partikels kann die Art der Diffusion bestimmt werden. Mit dem Ansatz:

$$MSD(t) \sim t^\alpha \quad \text{mit } \alpha > 0 \quad (4)$$

lässt sich aus der Skalierung des Anomalie-Parameters α die Art der Diffusion bestimmen. Für den Spezialfall $\alpha = 1$ erhält man eine Brownsche Bewegung (normale Diffusion). Für andere Werte von α ergibt sich:

- i) $\alpha < 1 \rightarrow$ subdiffusion
- ii) $\alpha = 1 \rightarrow$ normale Diffusion
- iii) $\alpha > 1 \rightarrow$ superdiffusion
- iv) $\alpha = 2 \rightarrow$ ballistische Bewegung

Mit stochastischen Analysen können aus scheinbar rein zufälligen Bewegungen noch Informationen gewonnen werden (z. B. durch die Auswertung der verschiedenen Momente, der Anomalie der Bewegung, der 'mean first passage time', ...). Auf der Grundlage solcher Betrachtungen wurden bereits viele Erkenntnisse über die Fortbewegung der verschiedensten Organismen erzielt. Beispielsweise wurden die unterschiedlichen Strategien der Futtersuche von verschiedenen Lebewesen näher untersucht (Humphries, et al., 2010), (Bartumeus, da Luz, Viswanathan, & Catalan, 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Langzeitsuchverhalten vieler Tiere (z. B. Albatrosse) die Merkmale eines sogenannten Lévy-Flugs aufweist. (Viswanathan, et al., 1996).

Levy-Flug

Ein Lévy-Flug ist eine Zufallsbewegung, bei der die Länge der einzelnen Sprünge eine Lévy-Verteilung besitzen. Eine Lévy-Verteilung ist eine endlastige Verteilung (heavy-tailed), die zur übergeordneten Familie der alpha-stabilen Verteilungen gehört (siehe Abbildung 4). Sie besitzt weder einen endlichen Erwartungswert noch eine endliche Varianz (d. h. die ersten beiden Momente dieser Verteilung sind unendlich). Sie hat die Form:

$$p(l) \sim l^{-1-\mu} \quad (4)$$

(Metzler & Klafter, 2000), wobei l die Länge eines Sprungs ist. Für den skalierenden Exponenten μ muss gelten: $1 < \mu < 2$. Eine Zufallsbewegung, deren Sprünge diese Verteilung besitzen, wird als Lévy-Flug bezeichnet.

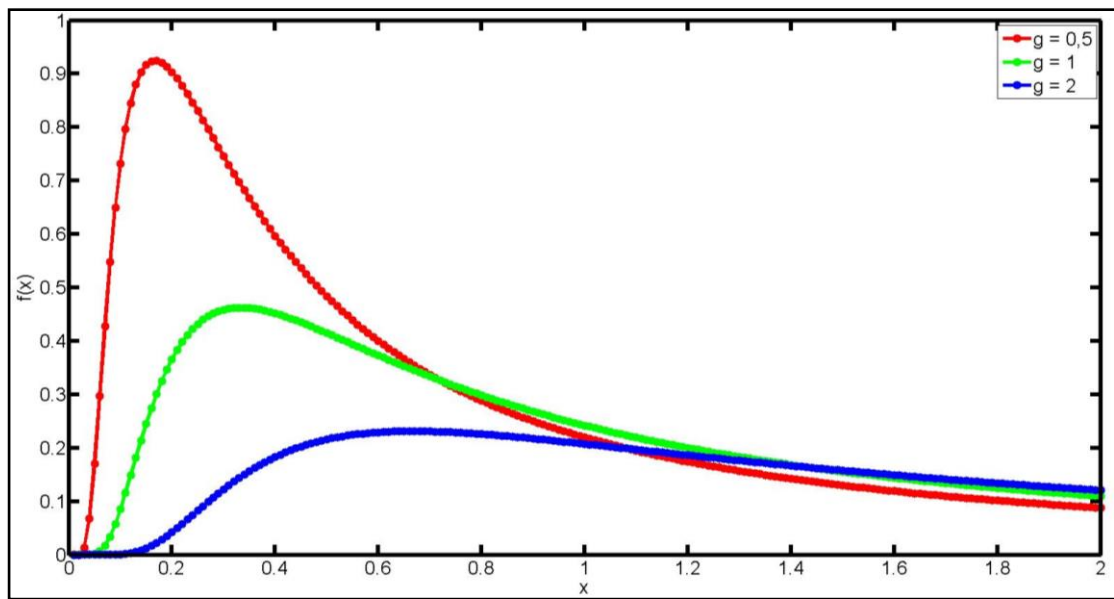


Abbildung 4: Lévy-Dichtefunktionen (f) mit unterschiedlichen Skalierungsfaktoren (g) und konstantem Lageparameter $\mu = 0$. Auffällig ist der langsame Abfall der Funktionswerte $f(x)$ für x -Werte größer als das Maximum der Funktion (heavy-tailed Verteilung). D. h. bei einem Lévy-Flug kommen auch noch (sehr) große Sprünge mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vor.

Ein Lévy-Flug hat die Eigenschaften einer superdiffusiven Bewegung und für die mittlere quadratische Verschiebung gilt:

$$MSD(t) \sim t^{2/\mu} \quad (5)$$

Ein Lévy-Flug besteht im Prinzip aus vielen kleinen zufälligen Bewegungen, die ab und zu von einer gerichteten Bewegung über eine größere Distanz (großer Sprung) unterbrochen werden. Da in ihm Anteile einer gerichteten Bewegung vorhanden sind, ist er keine Brownsche Bewegung. In mehreren Studien (Viswanathan, et al., 1999), (Viswanathan, et al., 2001), (Bartumeus, Catalan, Fulco, & Viswanathan, 2002) wurde die Effektivität einer Brownschen Bewegung und die eines Lévy-Flugs als Suchstrategie miteinander verglichen. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Szenarien unter vergleichbaren Bedingungen ein Lévy-Flug eine effektivere Suchstrategie ist.

2.2 Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Trotz der weitreichenden Einblicke über die Fortbewegung von lebenden Organismen in der Theorie, sind einfach handhabbare experimentelle Standardmodelle eher selten geblieben. Ein Organismus, der das Potenzial hat hier Abhilfe zu schaffen und als experimentelles Standardmodell dienen kann, ist der kleine Nematode *Caenorhabditis elegans*. Der Nematode bewegt sich aktiv mit einer kleinen Reynoldszahl in einer Vielzahl von unterschiedlichen Umgebungen. Damit lassen sich die theoretischen Aussagen experimentell überprüfen.

2.2.1 Ein Kurzportrait von *C. elegans*

Aufzucht und Haltung

Die Aufzucht und Haltung von *Caenorhabditis elegans* ist aus mehreren Gründen einfach zu bewältigen. Da *C. elegans* (fast) ausschließlich selbstbefruchtende Hermaphroditen sind,

kann eine gesamte Population auf einer Agarplatte von nur einem einzigen Nematoden entstehen. Die gesamte Entwicklung vom befruchteten Ei bis zum adulten Nematoden dauert nur 3 Tage. Darüber hinaus können sie bei Temperaturen zwischen 12 °C und 25 °C gehalten werden und stellen keinerlei Gefahr für den Menschen dar. Auch das benötigte Futter (E. Coli) lässt sich einfach züchten. Des Weiteren wird für die Aufzucht und Haltung der Nematoden keine teure Ausrüstung und nicht viel Platz benötigt. All dies und noch etliche weitere Gründe machen *Caenorhabditis elegans* zu Forschungsobjekten von großer Beliebtheit (Corsi, Wightman, & Chalfie, 2015).

Beobachtungsverfahren

Aufgrund ihrer Größe (bis zu 1 mm) können adulte Nematoden bereits mit bloßem Auge gesehen werden, bzw. für ihre Beobachtung werden aufwendige optische Aufbauten nicht zwingend vorausgesetzt. Beispielsweise wurde für die Aufzucht und Haltung, der für diese Arbeit beobachteten Nematoden, nur ein handelsübliches Stereomikroskop (Leica MDG33) verwendet. Auch für die Präparation der Probenhalter wurde keine zusätzliche Hardware benötigt. Da die Nematoden transparent sind, können mit höher auflösenden Lichtmikroskopen einzelne Zellen von lebenden *C. elegans* beobachtet werden. Ebenfalls sind die Differenzialinterferenzkontrast-Methode (DIC) und die Fluoreszenz-Mikroskopie beliebte Verfahren zur Beobachtung der Nematoden, da mit fluoreszierenden Proteinen u. a. Entwicklungsabläufe, Zellentwicklungen und Proteinwechselwirkungen in lebenden Organismen untersucht werden können (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994) (Thomas, Etchberger, Hobert, & Howard, 2006) (Feinberg, et al., 2008).

Körperform und Bewegung

Die Epidermis¹ durchläuft während der Entwicklung des Embryos mehrere Zellfusionen, um große mehrkernige epidermale Zellen zu bilden. Diese Zellen scheiden anschließend die darüberliegende Cuticula (Außenhaut) ab. Die Cuticula besteht im Wesentlichen aus Kollagen, Lipiden und Glycoproteinen (Chisholm & Hardin, 2005) und bestimmt die Form der Nematoden. Ebenfalls stellt die Cuticula die Ankerpunkte der Muskelkontraktion. Dies wird über eine Verbindung der Epidermis mit den Muskeln ermöglicht. Daher führen Veränderungen an der Cuticula zu einer deutlichen Änderung der *C. elegans*-Bewegung. Beispielsweise führen Änderungen an den Kollagen-Genen zu Mutationen (Roller Phänotyp), die sich wie ein „Korkenzieher“ fortbewegen (Brenner, 1974). Die Muskeln bestehen aus insgesamt 95 Zellen und laufen in vier Quadranten entlang der Längsseite des Nematoden. Bei den ausschließlich innenliegenden Muskeln handelt es sich um Skelettmuskeln, die mit der Epidermis verbunden sind. Die Muskelzellen haben nur einen Kern und besitzen mehrere Sakomere (Moerman & Fire, 1997). Das periodische Zusammenziehen und Entspannen dieser Muskeln führt zu der eleganten sinusförmigen Bewegung der Nematoden, was den Ursprung ihres Namens (*C. elegans*) erklärt.

¹ Zellen des äußeren Epithels (Deckgewebes)

2.2.2 Entwicklungszyklen von *C. elegans*

Bei einer Temperatur von 20 °C dauert die Embryogenese in etwa 16 Stunden. Da der Embryo von einer nahezu undurchlässigen Eischale umschlossen ist, entwickelt er sich unabhängig von seiner Mutter. Dennoch bleiben die Embryonen bis zum 24-Zell-Stadium innerhalb des Hermaphroditen, bis sie schließlich gelegt werden. Mit 558 Zellkernen² schlüpfen die L1-Larven und beginnen sofort nach dem Schlüpfen Bakterien zu fressen. Die Larven entwickeln sich in 4 Stadien (L1 - L4) zu adulten Nematoden heran. Das L1-Stadium dauert zirka 16 Stunden und für die anderen drei Stadien werden jeweils ungefähr 12 Stunden benötigt. Jedes Larvenstadium endet mit einer inaktiven Phase (Lethargus), in der eine neue Cuticula (Außenhaut aus Kollagen) gebildet wird (Raizen, et al., 2008). Die inaktive Phase endet mit einer Häutung, bei der die alte Außenhaut abgestreift wird. Ungefähr 12 Stunden nach der letzten Häutung (L4-Häutung) beginnen die ausgewachsenen Hermaphroditen für zwei bis drei Tage Nachkommen zu zeugen. Dabei zeugt der Hermaphrodit solange Nachkommen, bis sein eigenes Spermia vollständig aufgebraucht ist. Danach kann er nur noch dann weitere Nachkommen zeugen, wenn er sich mit einem Männchen paart. Eine Paarung zwischen zwei Hermaphroditen ist nicht möglich. Nach der Reproduktionsphase leben die Hermaphroditen noch für mehrere Wochen.

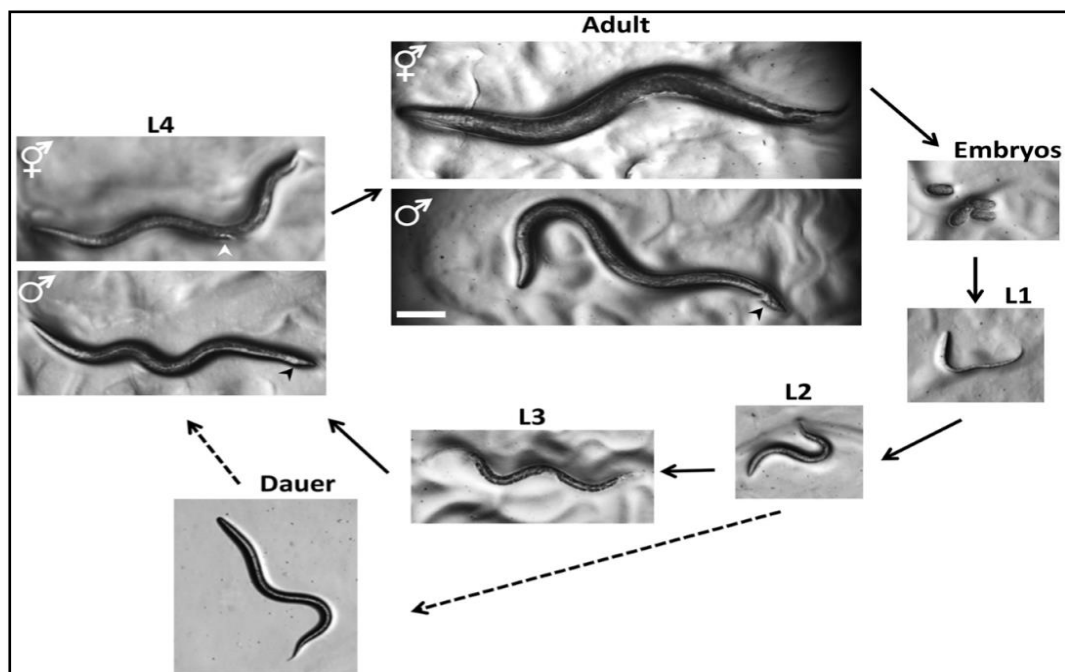


Abbildung 5: Die Lebenszyklen von *C. elegans* vom befruchteten Ei bis hin zum adulten Nematoden. Die gesamte Entwicklung dauert in etwa 3 Tage. Solange ausreichend Futter vorhanden ist, wachsen die Larven kontinuierlich in allen 4 Entwicklungsstadien. Die unterschiedlichen Geschlechter sind bis zum L4-Stadium nur schwer zu unterscheiden. Im L4-Stadium besitzen die Hermaphroditen einen konischen Schwanz und eine entwickelte Vulva (weiße Pfeilspitze), die in Form eines Halbkreises mittig auf der Bauchseite deutlich zu sehen ist. Die Männchen haben im L4-Stadium bereits einen breiteren Schwanz (schwarze Pfeilspitze). Allerdings ist der fächerförmige Schwanz der adulten Männchen im L4-Stadium noch nicht zu erkennen. Die beiden Hauptmerkmale, mit denen das Geschlecht adulter *C. elegans* einfach festgestellt werden kann, sind der breitere Umfang und der konische Schwanz der Hermaphroditen bzw. der schlankere Umfang und der fächerförmige Schwanz der Männchen (schwarze Pfeilspitze). Der schlankere Umfang der Männchen kann mit den kleineren Geschlechtsdrüsen (Gonaden) und dem Fehlen von Embryos im Inneren erklärt werden. Die beiden Geschlechter unterscheiden sich auch in der Anzahl ihrer Nervenzellen. Die Männchen besitzen 383 Neuronen, wohingegen die Hermaphroditen nur 302 Neuronen besitzen (Sulston & Horvitz, 1977), (White, Southgate, Thomson, & Brenner, 1986). Die Länge des weißen Balkens beträgt 0,1mm.

Quelle: wormbook.org

² Die Anzahl an Zellen ist geringer als die Zahl der Zellkerne (558), da einige Zellen mehrere Kerne besitzen.

Finden die Larven während ihrer Entwicklung nicht genügend Futter (Bakterien), schlagen die L2-Larven einen alternativen Entwicklungszyklus ein (Hu, 2007). In diesem Fall entwickeln sich die L2-Larven in ein abweichendes L3-Stadium, dem Dauerstadium. Im Dauerstadium wird die Larve vollständig von der Cuticula umschlossen. Da keine Nahrungsaufnahme mehr stattfindet, stoppt die Weiterentwicklung der Larve. In diesem Zustand kann die Larve über mehrere Monate verharren. Auch besitzt die Cuticula im Dauerstadium eine höhere Widerstandsfestigkeit, was die Larve besser gegenüber Umwelteinflüssen schützt. Ist wieder genug Futter in der Umgebung der Larve vorhanden, wird die Schutzhülle über dem Mund abgestoßen und die Nahrungsaufnahme beginnt wieder. Mit Beginn der Nahrungsaufnahme geht auch die Weiterentwicklung der Larve wieder voran. Jedoch entwickeln sich Larven, die sich einmal im Dauerstadium befunden haben, in eine geringfügig unterschiedliche L4-Larve.

2.2.3 Bewegungsdynamik von *C. elegans*

Im Allgemeinen wird die Fortbewegung von *C. elegans* als chemotaktisch betrachtet, d. h. bei der Suche nach Futter folgen die Nematoden einem Gradienten in Richtung der höheren Konzentration ihrer Nahrung (Ferrée & Lockery, 1999). Kürzlich wurde jedoch festgestellt, dass die Nematoden auch in der Lage sind, umgebungsabhängige Suchstrategien für die Futtersuche (Infotaxis) anzuwenden, wenn ihnen das Futter entzogen wird und kein chemischer Gradient vorhanden ist, dem sie folgen können (Calhoun, Chalasani, & Sharpee, 2014). In ihrem natürlichen Lebensraum müssen die Nematoden zur Futtersuche sowohl schwimmende Bewegungen durch (wässrige) viskose Umgebungen als auch kriechende Bewegungen durch (matschige) viskoelastische Umgebungen machen. Es ist immer noch nicht ganz geklärt, ob die kriechende und schwimmende Fortbewegung die beiden unterschiedlichen Extreme der gleichen Fortbewegungsform sind, das Resultat eines einzelnen neuronalen Schaltkreises (Berri, Boyle, Tassieri, Hope, & Cohen, 2009), (Boyle, Berri, Tassieri, Hope, & Cohen, 2011), oder ob es sich um zwei verschiedene Fortbewegungsformen handelt, die durch funktionell unterschiedliche neuronale Schaltkreise ermöglicht werden (Vidal-Gadea, et al., 2011). Die Nematoden zeigen bei ihrer Fortbewegung durch die verschiedenen Umgebungen eine Vielzahl an unterschiedlichen Körperformen und Bahnkurven (siehe Abbildung 6).

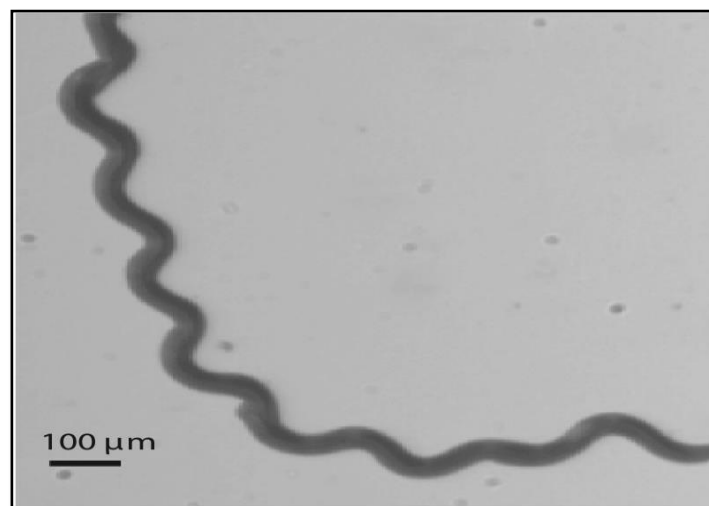


Abbildung 6: typische Bahnkurve eines Nematoden auf einer Agarplatte.

Quelle: Padmanabhan, et al., 2012

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Körperformen und Bahnkurven der Nematoden bei ihrer Fortbewegung auf Agarplatten mit einfachen analytischen Funktionen beschrieben werden können (Padmanabhan, et al., 2012). In dieser analytischen Beschreibung wird davon ausgegangen, dass die durch den Nematoden laufende Krümmungswelle am Kopf beginnt und sich anschließend durch den gesamten Körper ausbreitet. In diesem Fall lassen sich (nahezu) alle Körperformen von *C. elegans* während der Fortbewegung mit einfachen harmonischen Funktionen beschreiben. Auch die Bahnkurven der Nematoden auf den Agarplatten lassen sich dann stückweise mit sinusförmigen Funktionen beschreiben. Die dafür verwendeten Funktionen besitzen abrupte Änderungen der Amplitude, des Wellenvektors und der Phase. In viskosen Umgebungen hingegen bewegt sich *C. elegans* mit periodischen (Schwimm-)Bewegungen vorwärts, da er für die Fortbewegung in jedem Bewegungszyklus seinen Körper wellenartig verformt (siehe Abbildung 7). Diese wellenförmige Fortbewegung ist eine weitverbreitete Fortbewegungsform von Organismen, die sich mit kleinen Reynoldszahlen in viskosen Umgebungen vorwärtsbewegen. Die exakte Form dieser Krümmungswellen, die durch den gesamten Körper des Nematoden laufen, hängen von den lokalen Krümmungen und den Phasenverschiebungen zwischen den benachbarten Segmenten des Nematoden ab (Gray & Hancock, 1955).

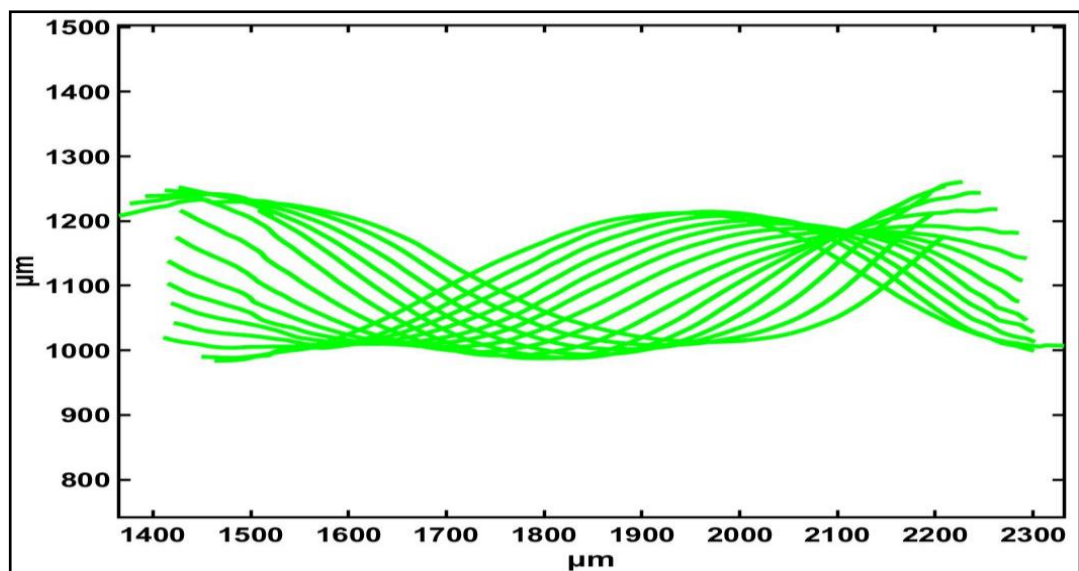


Abbildung 7: Schwimmbewegung eines Nematoden. Die Abbildung zeigt die typische Verformung von *C. elegans* bei ihrer Fortbewegung durch ein viskoses Medium (M9-Puffer). Die grünen Linien sind die Mittellinien eines Nematoden, der sich in reinem M9-Puffer bewegt. Der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen (grüne Linien) beträgt 1/30 Sekunde.

Um die Fortbewegung von *C. elegans* in viskosen Umgebungen besser verstehen zu können, wurden sogar die Materialeigenschaften von *C. elegans* bestimmt (Sznitman, Purohit, Krajacic, Lamitina, & Arratia, 2010). Dazu wurde das Schwimmverhalten der Nematoden mit einem mathematischen Modell beschrieben, das es erlaubte, die Materialeigenschaften von *C. elegans* abzuschätzen. Für den Wildtyp von *C. elegans* ergab sich für das Elastizitätsmodul (E) ein Wert von ca. $3,77 \text{ kPa}$ und eine Viskosität des Gewebes (η) von ca. $-860 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Der Wert von η ist negativ, weil das Gewebe der Nematoden bei der Bewegung durch ein Medium eher Energie erzeugt als verbraucht. In diesem Experiment stellte sich ebenfalls heraus, dass die Materialeigenschaften von *C. elegans* eine große Abhängigkeit von den funktionellen Eigenschaften der Muskeln haben. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die verschiedenen Phänotypen von *C. elegans* neu zu charakterisieren.

2.3 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Die Nematoden *C. elegans* haben sich in vielen Versuchen als verlässliches Standardmodell zur experimentellen Überprüfung von theoretischen Modellen erwiesen. Daher wurde ihre (aktive) Fortbewegung und die dahinterliegenden Mechanismen bereits eingehend untersucht. Dabei wurde die Bewegung der Nematoden in unterschiedlichen Umgebungen ebenso betrachtet (Shen & Arratia, 2011) (Fang-Yen, Raizen, & Trojanowski, 2016) (Gagnon, Shen, & Arratia, 2013) (Riley & Lauga, 2014) (Butler, et al., 2014) (Backholm, Kasper, Schulman, Ryu, & Dalnoki-Veress, 2015), wie die auftretenden Strömungsfelder in Flüssigkeiten, durch die sich ein Nematode bewegt (Gagnon, Keim, & Arratia, 2014). In diesen Experimenten hat sich immer wieder gezeigt, dass die Bewegung der Nematoden auch abhängig ist von den viskoelastischen Eigenschaften ihrer näheren Umgebung. (siehe Abbildung 8).

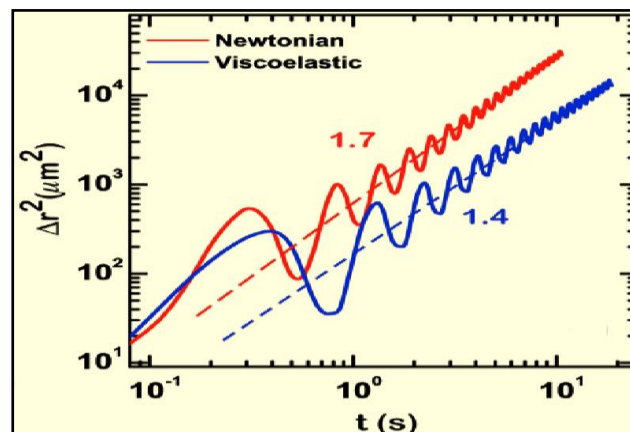


Abbildung 8: mittlere quadratische Verschiebung der Bewegung von *C. elegans* in unterschiedlichen Umgebungen. In der obigen Abbildung sind die MSD's eines Nematoden gezeigt, der sich in einer newtonschen Flüssigkeit (rot) und einer viskosen Flüssigkeit (blau) bewegt. Wie (unter anderem) aus der obigen Abbildung hervorgeht, ist der Anomalie-Parameter der Nematoden-Bewegung abhängig von den viskoelastischen Eigenschaften der Umgebung, in der sich der Nematode bewegt.

Quelle: Shen & Arratia, 2011

Da der Ursprung der kriechenden und schwimmenden Fortbewegung noch immer nicht ganz geklärt ist (einzelner oder mehrere neuronale Schaltkreise, siehe Kapitel 2.2.3), ist das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, wie sich grundlegende physikalische Größen zur Beschreibung der Nematoden-Bewegung beim Übergang von viskoser hin zu viskoelastischer Umgebung verhalten (Bewegungsanalyse). Dabei sollen die wesentlichen Veränderungen der Fortbewegung, einschließlich die Änderung der Körperform, herausgearbeitet werden. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, wie gut die Nematoden in der Lage sind, ihre Fortbewegung an die viskoelastischen Eigenschaften ihrer näheren Umgebung anzupassen, und ob es eine viskoelastische Umgebung gibt, in der sich die Nematoden optimal fortbewegen können. Dabei bedeutet „sich optimal fortzubewegen“, dass:

- die Anomalie der Bewegung maximal wird, bzw.
- eine beliebige Distanz am schnellsten zurückgelegt werden kann, bzw.
- die geringsten Umwege bei der Fortbewegung gemacht werden.

Kurz gesagt, mit einer quantitativen Bewegungsanalyse soll eine umfangreiche Charakterisierung der aktiven Fortbewegung von *C. elegans* in unterschiedlich viskoelastischen Umgebungen (von flüssig bis nahezu fest) erfolgen.

3 Probenpräparation und experimenteller Aufbau

Inspiziert von bereits realisierten Wurm-Trackingsystemen (Ramot, Johnson, Berry, Jr, Carnell, & Goodman, 2008), (Baek, Cosman, Feng, Silver, & Schafer, 2002), (Tsibidis & Tavernarakis, 2007) wurde für die quantitative Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* ein spezielles Durchlichtmikroskop (Wurmtracker) entworfen und gebaut. Zusätzlich wurde für das Mikroskop ein besonderes Verfahren zur Kalibrierung entwickelt, das eine einfache und exakte Kalibrierung ermöglicht. Das Durchlichtmikroskop, die Kalibrierungsmethode und die verwendeten Probenhalter für die Präparation der Nematoden wurden eigenständig und extra für diese Arbeit entwickelt.

3.1 Kultivierung von *C. elegans*

a) Aufzucht und Haltung

Die verwendeten *C. elegans* (Stamm XA3501) wurden auf einer Agarplatte im Wärmeschrank bei 21 °C gehalten. Bei der Aufzucht wurde stets darauf geachtet, dass die Nematoden genug Futter (*Escherichia coli* - Stamm OP50) zur Verfügung hatten. Dadurch verlief ihre Entwicklung vom befruchteten Ei bis hin zum adulten *C. elegans* innerhalb von 3 Tagen und die Larven sind nicht in das Dauerstadium gefallen. Die Nematoden wurden alle 3 Tage auf eine neu vorbereitete Agarplatte umgesetzt. Zur Vorbereitung einer neuen Agarplatte wurde zunächst mit einer Pipette 100 µl einer *E. coli* - Suspension auf die Platte geträufelt. Anschließend wurde die aufgebrachte Suspension mit einem Glaslöffel gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt. Um Verunreinigungen bei der Vorbereitung der Agarplatten zu vermeiden, führten wir diesen Schritt dicht neben der Flamme eines Bunsenbrenners durch. Auch verwendeten wir für das Aufbringen der Suspension sterile Pipettenspitzen. Nach dem Aufbringen der Suspension wurde die Platte noch für einen Tag in den Inkubator bei 38 °C gelegt, damit die Bakterien genügend Zeit hatten, sich in ausreichender Menge zu vermehren und einen „Teppich“ auf der gesamten Oberfläche zu bilden. Für das Umsetzen der Nematoden wurde mit einem Skalpell eine etwa 1,5 cm² große Fläche aus der alten Platte ausgeschnitten und verkehrt herum auf die neue Platte gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich genügend adulte *C. elegans* auf dem ausgeschnittenen Stück befanden. Dieser Arbeitsschritt wurde ebenfalls dicht neben der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Um den umgesetzten Nematoden auf der neuen Agarplatte genug Zeit zur Vermehrung zu geben, wurde die neue Platte für 24 Stunden in den Wärmeschrank bei 21 °C gestellt. Danach wurden die Nematoden auf dieser Platte für die Messungen verwendet. Für die Messungen wurde die Agarplatte nur kurz aus dem Wärmeschrank genommen und die Nematoden wurden mit einem speziellen Stab, an dessen Spitze ein dünner Draht befestigt war, vorsichtig von der Platte gepickt. Anschließend wurde die Platte gleich wieder zurück in den Wärmeschrank gelegt. Aufgrund der hier beschriebenen Vorgehensweise war es möglich, für die Messungen immer ausgewachsene und gut genährte Nematoden in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben.

b) Herstellung und Viskoelastizität der Umgebungen

Die unterschiedlichen Umgebungen (Agarose-Lösungen), in denen die Bewegung der Nematoden untersucht wurde, bestanden aus M9-Puffer mit einem variierenden Anteil an

Agarose (Roth, low-melt agarose). M9-Puffer³ ist ein Puffer, dessen Bestandteile Wasser (H₂O), Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Natriumchlorid (NaCl) und Magnesiumsulfat (MgSO₄) sind. Der Agarose-Anteil der Lösungen ist immer in Gewichtsprozent [Gew.-%] angegeben. Damit auch die Lösungen mit einem hohen Agarose-Anteil flüssig und homogen blieben, wurden alle Agarose-Lösungen nach ihrer Herstellung in einem Schüttler bei 40 °C ständig in Bewegung gehalten und (wie die *C. elegans*-Platten) nur kurzzeitig für die Messungen herausgenommen.

Messung des komplexen Schubmoduls

Mit einem Rheometer (Bohlin Gemini HR, Malvern Instruments) wurde der komplexe Schubmodul $G(w) = G'(w) + iG''(w)$ im Frequenzbereich $0,01 \text{ Hz} \leq w \leq 10 \text{ Hz}$ der verschiedenen Agarose-Lösungen bestimmt. Der obige Frequenzbereich wurde ausgewählt, da sich die Bewegung der Nematoden in diesem Frequenzbereich vollzieht. Als Messgeometrie des Rheometers wurden für die Oszillationsmessungen das Platte-Platte Messsystem verwendet, da aufgrund der geringen Probenmenge die Agarose-Lösungen schneller auf die Mess-temperatur von 20 °C abkühlten und der Materialverbrauch der Lösungen minimiert wurde. Die Agarose-Lösungen wurden für die Messungen nur kurzzeitig aus dem Schüttler genommen. Zu Beginn jeder Messung wurden 100 µl der Agarose-Lösung mittig auf die untere Platte des Rheometers pipettiert. Nach dem Aufbringen der Probe wurde 15 Minuten lang gewartet, um die Agarose-Lösungen auf die Messtemperatur abkühlen zu lassen. Bei den Messungen wurde zunächst mit zwei Amplitudentests (Amplitudensweep) der linear-viskoelastische Bereich jeder Probe bei 1 Hz und 10 Hz bestimmt. Anschließend wurde mit einem Frequenzsweep der komplexe Schubmodul im Frequenzbereich $0,01 \text{ Hz} \leq w \leq 10 \text{ Hz}$ gemessen (siehe Abbildung 9), (vollständiges Messprotokoll eines Amplituden- und Frequenzsweeps im Anhang).

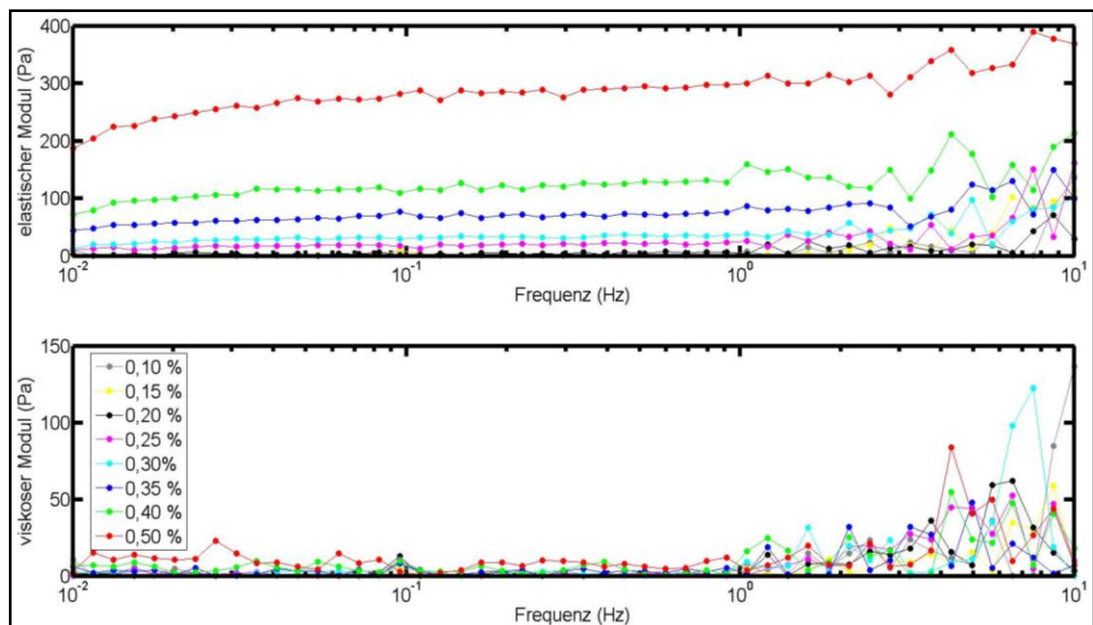


Abbildung 9: Bestimmung des komplexen Schubmoduls $G(w) = G'(w) + iG''(w)$. **(oben)** elastischer Modul G' und **(unten)** viskoser Modul G'' der gemessenen Proben in Abhängigkeit der Frequenz. Bei jeder Messung wurden 50 Datenpunkte im Frequenzbereich $0,01 \text{ Hz} \leq w \leq 10 \text{ Hz}$ erstellt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind im Frequenzbereich $0,2 \text{ Hz} \leq w \leq 5 \text{ Hz}$ die beiden Module (nahezu) frequenzunabhängig. In der Legende **(unten)** ist der Agarose-Anteil der verschiedenen Proben eingetragen.

³ Ein vollständiges Protokoll zur Herstellung von M9-Puffer ist zu finden unter: „https://www.princeton.edu/genomics/botstein/protocols/M9_Buffer.htm“.

Die Messungen zeigen, dass sowohl das elastische Modul G' als auch das viskose Modul G'' im Frequenzbereich $0,2 \text{ Hz} \leq \omega \leq 5 \text{ Hz}$ nur eine geringe Frequenzabhängigkeit haben. Die Ergebnisse stimmen gut mit vorhergehenden Messungen überein (Deepthi, Bhargavi, Jagadeesh, & Vijaya, 2010).

c [%]	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,50
G' [Pa]	6,4	8,8	9,4	25,6	41,9	78,0	136,3	302,0
G'' [Pa]	8,2	4,0	6,8	10,4	6,7	9,5	10,5	13,9

Tabelle 1: Abhängigkeit des viskosen und elastischen Moduls von der Agarosekonzentration des M9-Puffers. In der Tabelle sind die Mittelwerte der beiden Moduln im Frequenzbereich $0,2 \text{ Hz} \leq \omega \leq 5 \text{ Hz}$ eingetragen. Wie ersichtlich wird, hat das viskose Modul G'' nur eine geringfügige Abhängigkeit von der Agarosekonzentration. Hingegen gilt für die Konzentrationsabhängigkeit des elastischen Moduls in etwa $G' = 2e^{10c}$ (siehe Abbildung 10). Damit werden mit steigendem Agarose-Anteil die Umgebungen, in denen sich die Nematoden bewegen, elastischer.

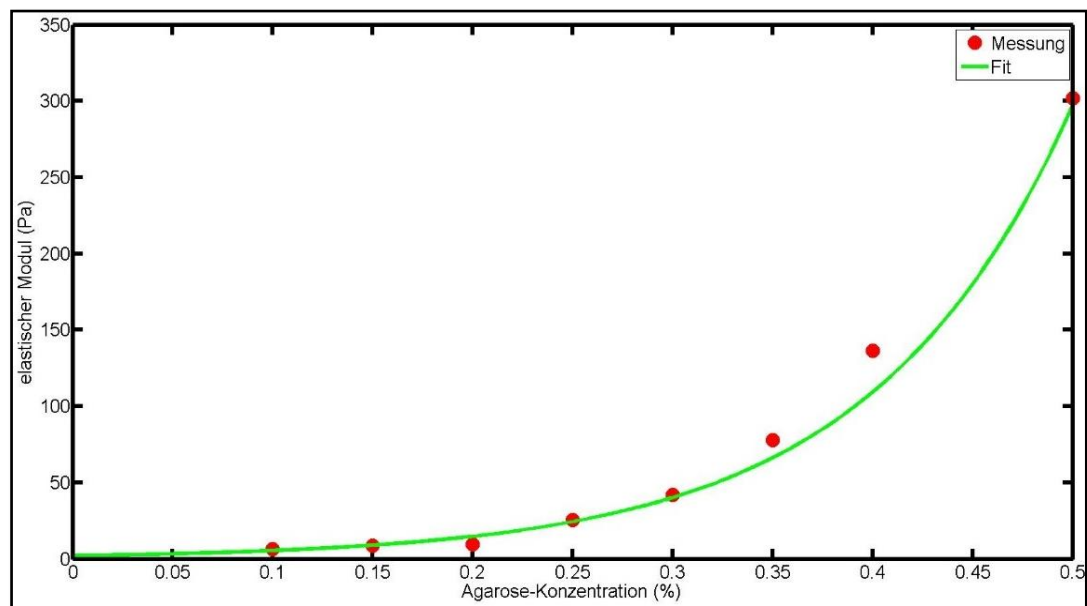


Abbildung 10: Abhängigkeit des elastischen Moduls (G') von der Agarose-Konzentration der Probe (c). Während das viskose Modul (nahezu) konstant bleibt, steigt das elastische Modul mit zunehmender Agarose-Konzentration der Probe. Für die Konzentrationsabhängigkeit des elastischen Moduls gilt in etwa: $G' = 2e^{10c}$.

c) Die Präparation der Nematoden

Für die Messungen wurden die Nematoden einzeln per Hand von der Platte gepickt und vorsichtig in einen vorbereiteten Probenhalter gesetzt. Je nach Aufnahme-Verfahren wurden dafür zwei verschiedene Probenhalter verwendet (siehe Abbildung 11). Die beiden Probenhalter unterscheiden sich in der Größe ihres maximal verfügbaren Messbereichs (Das ist der Bereich, in dem sich der Nematode während der Messung frei bewegen kann).

i) Probenhalter I:

Der Probenhalter I besteht aus einer $7,5 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$ großen Glasplatte, zwei Abstandshaltern (Unterlegscheiben) und einem quadratischen Deckglas mit einer Kantenlänge von 2 cm . Für die Präparation wird zunächst mit einer Pipette ein $50 \mu\text{l}$ großer Tropfen der Agarose-Lösung mittig auf die Glasplatte gegeben. Anschließend werden die beiden Abstandshalter links und rechts neben dem Tropfen auf die Glasplatte geklebt. Danach wird der gepickte Nematode langsam in den Tropfen der Lösung gesetzt. Zum

Schluss wird das Deckglas so über den Tropfen gelegt, dass es gleichermaßen auf beiden Abstandshaltern aufliegt. Die beiden Abstandshalter verhindern ein seitliches Wegdrücken des Tropfens durch das Deckglas. Mit dem Deckglas wiederum wird sichergestellt, dass sich die Nematoden tatsächlich in der Agarose-Lösung bewegen müssen und nicht nur auf dessen Oberfläche schwimmen. Der maximal verfügbare Messbereich des Probenhalters I besitzt eine Größe von etwa $0,5 \text{ cm}^2$. Damit eignet sich dieser Probenhalter besonders gut für Messungen mit einem festen Messbereich, d. h. keine Verwendung der xy-Stage bei der Messung. Zum einen ist der verfügbare Messbereich groß genug, um einen Messbereich (Blickfeld der Kamera) zu finden, der den Rand des Tropfens nicht beinhaltet. Zum anderen ist der verfügbare Messbereich nicht zu groß, so dass der Nematode während einer Messung häufig genug durch den Messbereich läuft und getrackt werden kann.

ii) Probenhalter II

Der zweite verwendete Probenhalter besteht aus einer $10 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ großen Aluminiumplatte mit einem 3 cm großen Bohrloch in der Mitte und aus zwei runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von $3,5 \text{ cm}$. Für die Präparation wird zuerst mit Silikon ein Deckglas über das Bohrloch der Aluminiumplatte geklebt. Ist das Silikon getrocknet, wird die Platte umgedreht und das zugeklebte Bohrloch vollständig mit der Agarose-Lösung aufgefüllt. Anschließend wird der Nematode in die Lösung gesetzt und mit dem zweiten Deckglas wird das Bohrloch von oben verschlossen. Da die Aluminiumplatte auf beiden Seiten um das Bohrloch herum abgefräst ist, lassen sich die beiden Deckgläser vollständig in der Platte versenken. Der maximal verfügbare Messbereich des zweiten Probenhalters beträgt $(1,5 \text{ cm})^2 \cdot \pi \approx 7,1 \text{ cm}^2$. Daher eignet sich dieser Probenhalter besonders gut für das Tracking mit xy-Stage (d. h. der Nematode wird im Blickfeld der Kamera gehalten), da aufgrund des großen Messbereichs die Fortbewegung der Nematoden über größere Distanzen beobachtet werden kann.

Durch die Auswahl des passenden Probenhalters je nach Aufnahme-Verfahren kann der Verbrauch der Agarose-Lösungen optimiert werden.

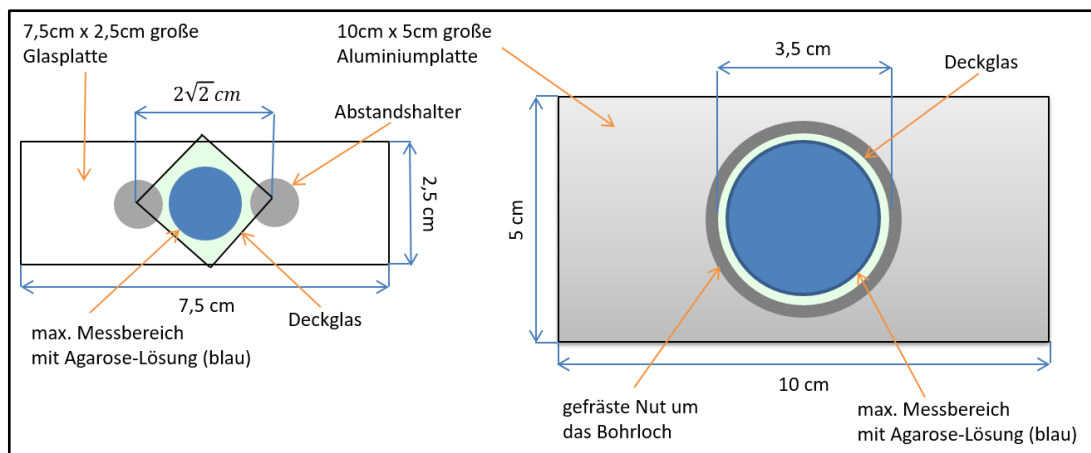


Abbildung 11: Maßstabsgetreue Zeichnung der verwendeten Probenhalter. Beide Probenhalter lassen sich schnell und einfach präparieren und können bei Bedarf auch mit mehreren Nematoden gleichzeitig bestückt werden. Des Weiteren lassen sich die beiden Probenhalter ohne großen Aufwand reinigen. Da alle Bauteile (nahezu beliebig oft) wiederverwendet werden können, ist der Materialverbrauch gering.

3.2 Experimenteller Aufbau des Wurmtrackers

Für die Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* wurde extra ein spezielles Durchlichtmikroskop entworfen (siehe Abbildung 12). Dieser sogenannte „Wurmtracker“ besteht im Wesentlichen aus drei Bauteilen: einer massiven Bodenplatte, einem höhenverstellbaren optischen Aufbau und einem fahrbaren Messtisch. Das Mikroskop ist in seinem Aufbau⁴ vergleichbar mit bereits vorhandenen Tracking-Systemen⁵.

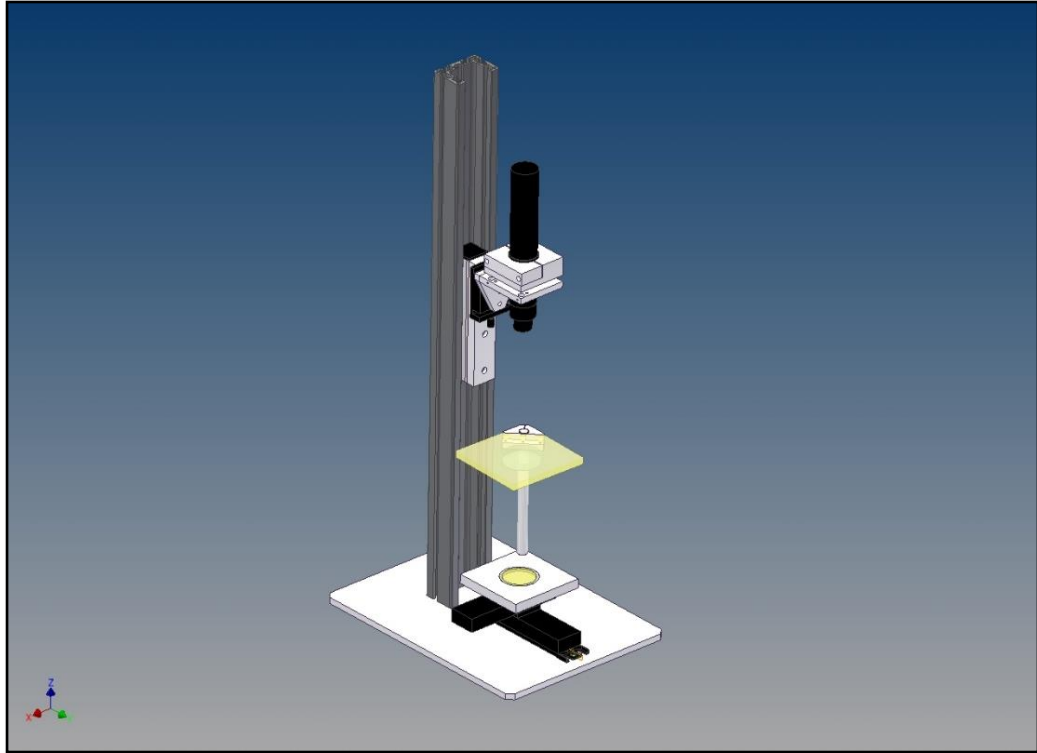


Abbildung 12: Detailzeichnung des entworfenen Wurmtrackers. Der von uns entworfene Wurmtracker arbeitet nach dem Prinzip eines Durchlichtmikroskops und besitzt einen fahrbaren Messtisch. D. h. bei den Messungen mit Verwendung der xy-Stage werden die Nematoden und nicht die Kamera bewegt. Gebaut wurde der Wurmtracker in der Mechanik-Werkstatt der Universität Bayreuth.

Quelle: Mechanik-Werkstatt

Bodenplatte

Eine 40 cm x 30 cm große Metallplatte gibt dem Wurmtracker eine hohe Standfestigkeit. Auf dieser Bodenplatte sind der fahrbare Messtisch und die Führungsschiene des optischen Aufbaus befestigt. Die 86 cm lange Führungsschiene des optischen Aufbaus ist aus Aluminium und steht senkrecht auf der Bodenplatte.

optischer Aufbau

Der optische Aufbau des Wurmtrackers (siehe Abbildung 13) ist mit einer speziellen Halterung in die Führungsschiene eingehängt und kann dadurch in seiner Höhe stufenlos verstellt werden. Ist der richtige Abstand zwischen Objektiv und Messtisch eingestellt, d. h. die Nematoden befinden sich im Fokus des Objektivs, kann mit einer Rändelschraube der gesamte optische Aufbau in der Führungsschiene fixiert werden. Die verwendete CCD-Kamera ist eine AVT Manta G-201 (Allied Vision Technologies GmbH) mit einem Sony ICX274 Sensor. Die Kamera

⁴ Die Datenblätter aller verwendeten Bauteile des Mikroskops befinden sich im Anhang.

⁵ <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/wormtracker/>

besitzt eine maximale Aufnahmegeschwindigkeit von 30 Bildern pro Sekunde bei einer Auflösung von 1234×1624 Pixeln. Des Weiteren hat die Kamera einen 32 MByte großen Bildzwischenspeicher (RAM) und verfügt über einen Global Shutter. Die Steuerung und Datenübertragung der Kamera erfolgen mittels GigE-Vision⁶ über eine Gigabit Ethernet Netzwerkkarte. An die Kamera ist über einen C-Mount Adapter (MVLCMC, Thorlabs GmbH) ein 2x Zwischenring (MVL20A, Thorlabs GmbH) angeschlossen. An diesen Zwischenring ist ein 6,5x Zoomobjektiv (MVL6X12Z, Thorlabs GmbH) mit einem 0,7x bis 4,5x Vergrößerungsbereich geschraubt und an das Zoomobjektiv ist nochmal eine 2x Vergrößerungslinse (MVL6X20L, Thorlabs GmbH) angebracht.



Abbildung 13: Die verwendete Hardware und die Reihenfolge der Komponenten des optischen Aufbaus. Die Hardware ermöglicht einen Vergrößerungsbereich von 2,8x bis 18x. Dieser Vergrößerungsbereich ist für die Aufnahme von adulten *C. elegans* völlig ausreichend.

Quelle: thorlabs.com

Die genaue Justierung des optischen Aufbaus in der Führungsschiene erfolgt mit insgesamt vier Feingewindeschrauben. Für die Ausrichtung parallel zum Messtisch werden drei Feingewindeschrauben benötigt und mit der vierten Schraube wird die exakte Höhe des optischen Aufbaus über dem Messtisch eingestellt.

Messtisch

Der Messtisch (siehe Abbildung 14) besitzt eine $13 \text{ cm} \times 13 \text{ cm}$ große Bodenplatte aus Metall. In diese Platte ist die Lichtquelle des Wurmtrackers integriert. Als Lichtquelle für das Mikroskop dient eine handelsübliche LED-Einbauleuchte mit einer Gesamtleistung von 1,65 Watt (Datenblatt im Anhang). Durch die Verwendung von LED's wird auch bei längeren Messzeiten eine zu große Wärmeentwicklung auf dem Messtisch vermieden. Direkt neben der Lichtquelle ist ein $20,5 \text{ cm}$ langer Führungsstab senkrecht auf die Bodenplatte des Messtisches geschraubt. An diesem Führungsstab ist parallel zur Bodenplatte eine Plexiglasscheibe befestigt. Der Abstand der Plexiglasscheibe von der Bodenplatte (bzw. der Lichtquelle) kann eingestellt werden. Auf diese Weise kann die Beleuchtung des Probenhalters reguliert werden, da für die Messungen der Probenhalter auf die Plexiglasscheibe gestellt wird. Um eine möglichst homogene Beleuchtung des gesamten Probenhalters zu bekommen, wurde eine matte Plexiglasscheibe in den Wurmtracker eingebaut. Der gesamte Messtisch ist auf einer xy-Stage befestigt und lässt

⁶ GigE-Vision ist ein Interface-Standard aus der industriellen Bildverarbeitung und ermöglicht den Anschluss von Kameras an vorhandene Netzwerksysteme durch Verwendung des Gigabit-Ethernet-Standards.

sich daher in der xy-Ebene verfahren. Die dafür eingebaute xy-Stage besteht aus zwei motorisierten, eindimensionalen Stages (MTS50/M-Z8E, Thorlabs GmbH), die über einen xy-Adapter (MTS50B-Z8, Thorlabs GmbH) miteinander verbunden sind. Die xy-Stage kann 5 cm in jede Richtung gefahren werden, wodurch sich ein maximal möglicher Messbereich von 25 cm² ergibt. Die Stage ist mit einem Adapter (MTS50A-Z8, Thorlabs GmbH) auf die Bodenplatte des Wurmtrackers geschraubt. Die Steuerung und Stromversorgung der Stage erfolgen über zwei T-Cube Controller (TDC001, Thorlabs GmbH) und einem Controller Hub (TCH002, Thorlabs GmbH). Der Hub ist über einen USB-Anschluss mit dem PC verbunden. Für die Programmierung der Stage wurde die auf ActiveX-Technologie basierende Thorlabs APT Software verwendet.

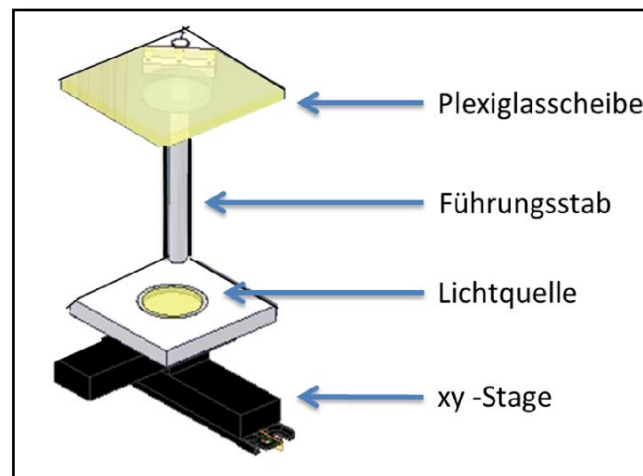


Abbildung 14: Messtisch des entwickelten Durchlichtmikroskops. Der Messtisch des Wurmtrackers besteht aus einer Plexiglasscheibe zur Probenaufnahme, einem Führungsstab zur Regulierung der Beleuchtung und einer Lichtquelle. Da der gesamte Messtisch auf einer xy-Stage steht, kann er in der xy-Ebene bewegt werden.

3.3 Kalibrierung und Einrichtung des Wurmtrackers

Die Kalibrierung des Wurmtrackers wird benötigt, um die Pixelgröße der aufgenommenen Bilder in Mikrometer umrechnen zu können. Wegen der stufenlos verstellbaren Vergrößerung des Objektivs muss nach jeder Änderung der eingestellten Vergrößerung eine neue Kalibrierung durchgeführt werden. Daher wurde ein eigenes Verfahren entwickelt, mit dem die Kalibrierung zügig und präzise durchgeführt werden kann. Für die Kalibrierung wurde auch ein eigener Probenhalter entworfen (siehe Abbildung 15).

i) Probenhalter für die Kalibrierung:

Der Probenhalter besteht aus einer 7,5 cm x 2,5 cm großen Aluminiumplatte mit einem 1 cm großen Bohrloch in der Mitte, zwei runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 1,5 cm und einem zirka 1 cm langen Messingdraht mit einem Durchmesser von 0,05 mm. Für die Präparation des Probenhalters wird zunächst ein Deckglas mit Silikon über das Bohrloch der Aluminiumplatte geklebt. Anschließend wird der Messingdraht mittig auf das geklebte Deckglas gelegt, so dass er dieses in etwa zwei gleich große Hälften teilt. Um den Draht zu fixieren, wird er an seinen beiden Enden mit Silikon auf das Deckglas geklebt. Zum Schluss wird mit dem zweiten Deckglas das Bohrloch von oben verschlossen. Da um

das Bohrloch herum auf beiden Seiten eine 4 mm breite Nut in die Aluminiumplatte gefräst ist, lassen sich die beiden Deckgläser vollständig in der Platte versenken. Dadurch sind die Deckgläser gut gegen Stöße bzw. Verkratzen geschützt.

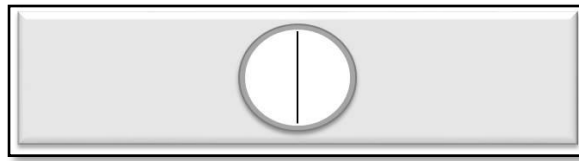


Abbildung 15: Probenhalter für die Kalibrierung. Für die Kalibrierung des Wurmtrackers wurde ein spezieller Probenhalter entwickelt. In diesem Probenhalter befindet sich mittig im Probenraum zwischen zwei Deckgläsern ein 0,05 mm dicker Messingdraht.

Für die Kalibrierung wird der Probenhalter auf das Unterteil einer Petrischale ($\varnothing = 5\text{ cm}$) gelegt, so dass er nur noch an den beiden Enden seiner Längsseiten aufliegt. Der Messingdraht muss ungefähr mittig über dem Boden der Petrischale schweben und darf diesen nicht berühren. Anschließend wird die Petrischale auf die Plexiglasscheibe des Messtisches gestellt. Dabei muss der Messingdraht direkt unter dem Objektiv der Kamera platziert werden, so dass er sich im Blickfeld der Kamera befindet. D. h. der Draht muss im Vorschaubild am PC deutlich zu erkennen sein. Danach wird die Petrischale noch solange per Hand verschoben und gedreht, bis sich der Messingdraht in etwa mittig im Vorschaubild befindet und parallel zu dessen x-Achse verläuft (siehe Abbildung 16, Position 1). Zum Schluss kann mit der Feineinstellung des Objektivs der Draht fokussiert werden. Den Rest der Kalibrierung übernimmt das hierfür (selbst) entwickelte Programm. Dabei geht das Programm in zwei Schritten vor:

Schritt 1: Finden der Bildränder

Im ersten Schritt wird der obere und untere Rand des Blickfelds der Kamera bestimmt (siehe Abbildung 16). Dazu wird der Messingdraht mit der y-Stage solange schrittweise nach oben gefahren, bis er sich nicht mehr im Blickfeld der Kamera befindet. Die letzte Fahrweite der Stage, bei der sich der Messingdraht noch vollständig im Blickfeld befindet, wird zwischengespeichert. Ist der Draht aus dem Blickfeld gefahren, wird die Fahrtrichtung der Stage umgedreht und der Draht solange in die andere Richtung gefahren, bis er erneut aus dem Blickfeld ist. Auch auf dieser Seite wird die letzte Fahrweite, bei der sich der Draht noch im Blickfeld befunden hat, zwischengespeichert. Die Länge der Strecke (in mm), welche die Stage bei jedem Schritt fährt, kann eingestellt werden. Je kleiner die eingestellte Strecke ist, desto genauer können die Ränder des Blickfelds bestimmt werden. Um die Position des Drahts im Bild zu bestimmen, macht die Kamera bei jedem Halt der Stage eine Aufnahme und schickt diese zur Auswertung⁷ an den PC. Im ersten übertragenen Bild wird das größte Objekt bestimmt und dessen Größe als Referenzgröße für alle folgenden Bilder verwendet. Befindet sich in einem der darauffolgenden Bilder ein Objekt, dessen Größe um weniger als 10% von der Referenzgröße abweicht, ist der Messingdraht noch im Blickfeld der Kamera. Dies bedeutet, dass die Stage den Draht noch einen Schritt weiter in die gleiche Richtung fahren kann. Befindet sich hingegen kein derartiges Objekt mehr im Bild, hat die Stage den Draht aus dem Blickfeld gefahren. Je nach Fortschritt der Kalibrierung wird nun entweder die Fahrtrichtung der Stage

⁷ Die einzelnen Schritte der Bildbearbeitung werden im nächsten Kapitel ausführlich behandelt.

geändert, oder die beiden Bildränder sind jetzt gefunden und es beginnt der zweite Schritt der Kalibrierung.

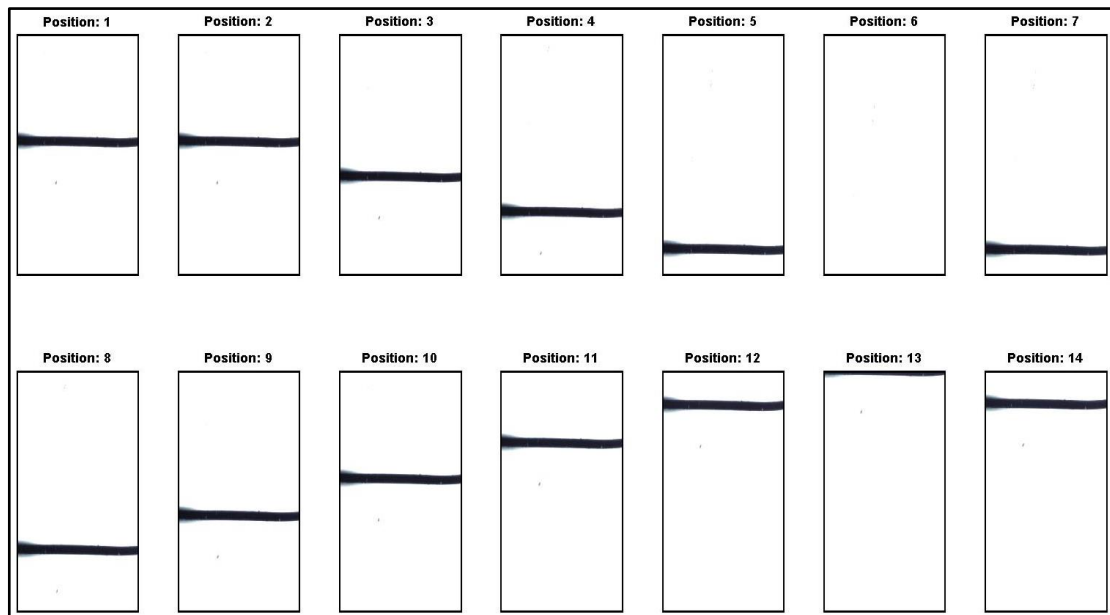


Abbildung 16: Auffinden der Bildränder. Der Messingdraht wird zunächst solange nach unten gefahren, bis er sich nicht mehr im Blickfeld der Kamera befindet (Position 6). Anschließend wird die Fahrtrichtung der y-Stage umgedreht und der Draht wird auf der entgegengesetzten Seite aus dem Blickfeld gefahren (Position 13). Die beiden Bildränder werden durch die Positionen 7 (= 5) und 14 (= 12) beschrieben. In der obigen Abbildung betrug die gefahrene Strecke der Stage bei jedem Schritt $0,3 \text{ mm}$ und die eingestellte Vergrößerung des Objektivs war $0,7\times$ (kleinstmögliche Vergrößerung).

Schritt 2: Bestimmung der Pixelgröße

Sind die beiden Bildränder gefunden, fährt die Stage den Messingdraht an den oberen Rand des Blickfelds. Dort angelangt, macht die Kamera ein Bild und überträgt dieses an den PC. Am Computer wird anschließend der Schwerpunkt des Drahts im Bild bestimmt und zusammen mit der aktuellen Fahrweite der Stage gespeichert. Dadurch erhält man zwei unterschiedliche Positionsangaben für die Position des Drahts:

- i) die aktuelle Fahrweite der Stage (in Millimeter)
- ii) die Koordinaten des Schwerpunkts im Bild (in Pixel)

Im nächsten Schritt fährt die Stage den Draht an den unteren Rand des Blickfelds und die Kamera macht eine weitere Aufnahme des Drahts (siehe Abbildung 17). Am PC werden erneut die Fahrweite der Stage und die Koordinaten des Schwerpunkts ermittelt. Aus der Differenz der Fahrweiten ergibt sich die Länge der gefahrenen Strecke in Millimeter und aus der Differenz der y-Koordinaten der Schwerpunkte ergibt sich die gefahrene Strecke in Pixeln. Aus dem Verhältnis der beiden Strecken zueinander lässt sich schließlich die Pixelgröße in Millimeter berechnen. Im nächsten Schritt fährt die Stage den Draht wieder zurück an den oberen Rand des Blickfelds und die beiden Positionsangaben des Messingdrahts werden aufs Neue ermittelt. Dadurch erhält man einen zweiten Umrechnungswert für die Pixelgröße. Für die Kalibrierung kann der Messingdraht beliebig oft zwischen den beiden Bildrändern hin und her gefahren werden. Aus N Fahrten der Stage ergeben sich $N-1$ Umrechnungswerte für die Pixelgröße. Die Anzahl an Fahrten der Stage kann vor Beginn jeder Kalibrierung eingestellt werden. Da die Pixel

aufgrund der quadratischen Zellen des CCD-Chips der Kamera ($4,4\ \mu\text{m} \times 4,4\ \mu\text{m}$) ebenfalls quadratisch sind, genügt es die Pixelgröße in einer Richtung zu bestimmen. Um Messungenauigkeiten durch Vibrationen des Mikroskops zu vermeiden, wird nach jeder Fahrt der Stage eine kurze Pause eingelegt, bevor die Kamera eine neue Aufnahme macht.

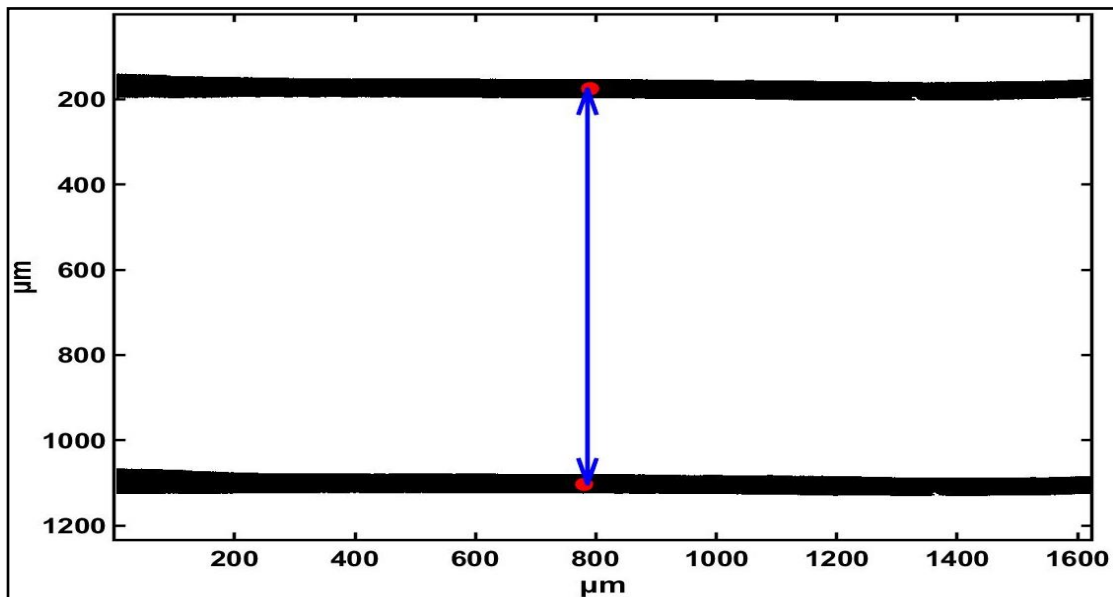


Abbildung 17: Berechnung der Pixelgröße. In der obigen Abbildung sind zwei (übereinander gelegte) Aufnahmen des Blickfelds der Kamera zu sehen. Einmal ist der Draht am oberen Rand des Bilds und einmal am unteren Rand des Bilds. Die beiden roten Punkte sind die Schwerpunkte des Drahts. Aus der Differenz der y-Koordinaten der beiden Schwerpunkte (Länge des blauen Doppelpfeils) ergibt sich die gefahrene Strecke in Pixeln. Aus dem Verhältnis der gefahrenen Strecke (in Pixeln) und der Differenz der beiden Fahrweiten der Stage (in mm) kann die Pixelgröße in Mikrometer berechnet werden.

durchgeführte Experimente:

Im ersten Experiment wurden die Pixelgrößen für unterschiedliche Zoomeinstellungen des Objektivs bestimmt. Für jede ausgewählte Zoomeinstellung wurde die Pixelgröße 100-mal gemessen (d. h. 101 Fahrten der Stage). Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Pixelgrößen für die unterschiedlichen Zoomeinstellungen berechnet (siehe Abbildung 18).

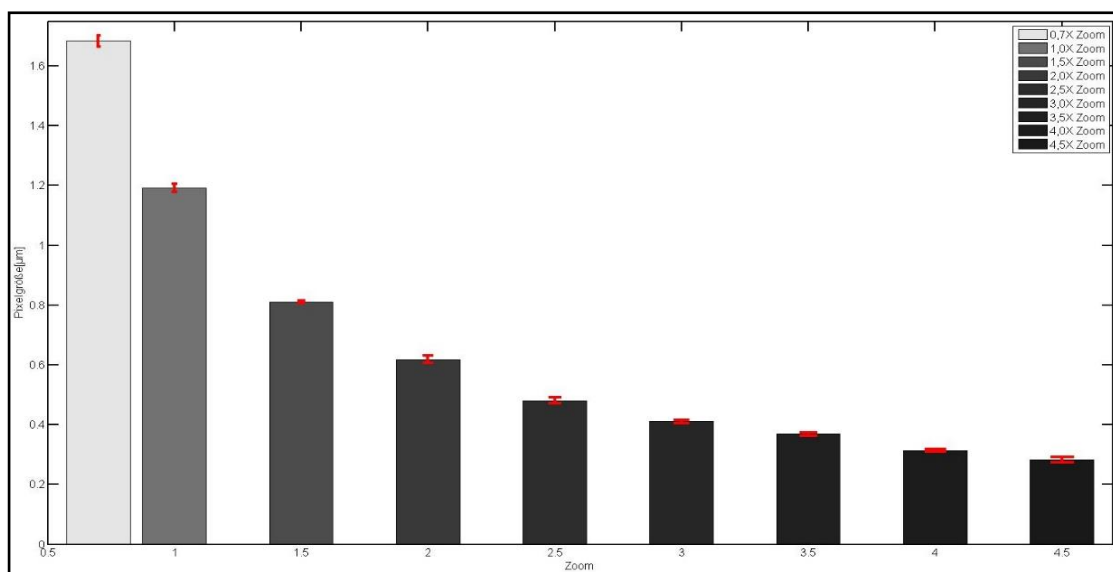


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen der eingestellten Vergrößerung des Objektivs und der Größe der Pixel (in μm) der aufgenommenen Bilder. Im ersten Experiment wurden die Pixelgrößen für die verschiedenen Zoomeinstellungen des Mikroskops bestimmt.

eingestellter Zoom:	0,7	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
Pixelgröße: [μm]	1,68	1,19	0,81	0,62	0,48	0,41	0,37	0,31	0,28
Abweichung: [nm]	18	14	4	12	10	6	6	5	9

Tabelle 2: In der obigen Tabelle sind die Ergebnisse des ersten Experiments zu sehen. Gemessen wurde die Größe eines Pixels in Abhängigkeit der eingestellten Vergrößerung des Objektivs. Die Streuung der einzelnen Messwerte ist für alle Zoomeinstellungen minimal und liegt im Nanometerbereich (3. Zeile in der Tabelle).

Mit einem linearen Fit ergibt sich für den Zusammenhang zwischen dem Kehrwert der Pixelgröße P^{-1} und dem eingestellten Zoom Z die Ausgleichsgerade:

$$P^{-1} = 0,7744 \frac{1}{\mu\text{m}} \cdot Z + 0,07404 \frac{1}{\mu\text{m}} \quad (6)$$

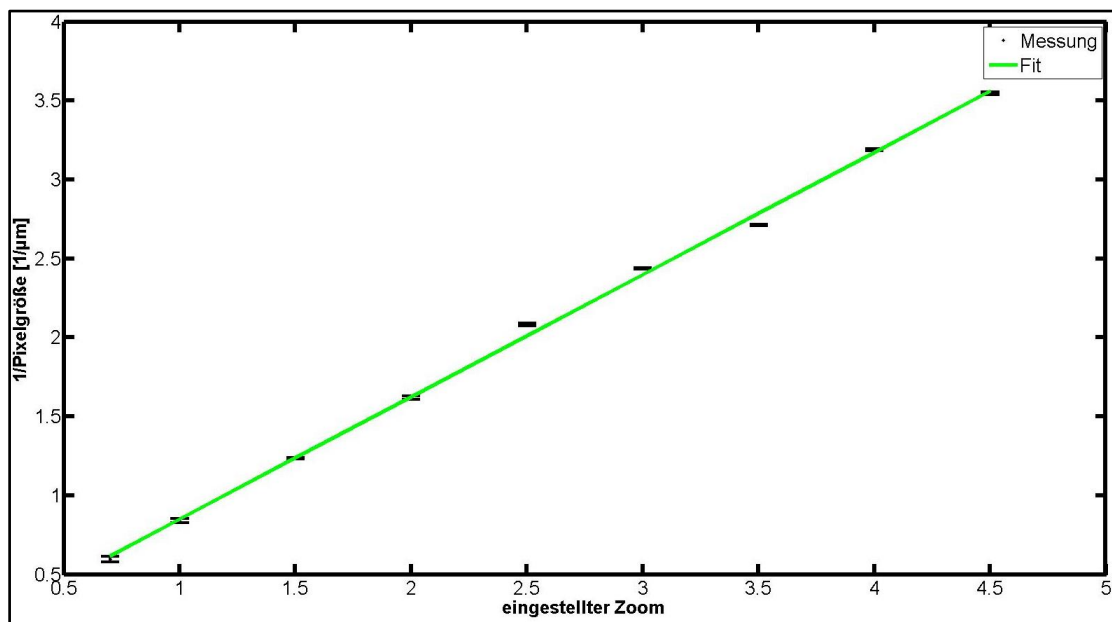


Abbildung 19: Im ersten Experiment wurde die Pixelgröße in Abhängigkeit des verwendeten Zooms bestimmt. Trägt man anschließend den Kehrwert der Pixelgröße über der eingestellten Vergrößerung auf, wird der (erwartete) lineare Zusammenhang zwischen den beiden Größen deutlich. Die kleinen Abweichungen der Messwerte (schwarze Punkte) von der Ausgleichsgeraden (grün) lassen sich dadurch erklären, dass die exakte Einstellung der Vergrößerung am Objektiv schwierig ist, da es sich um eine stufenlose Einstellung handelt.

In einem weiteren Experiment wurde die Pixelgröße (in μm) für die kleinste Vergrößerung des Objektivs (0,7x) noch genauer bestimmt. Die Pixelgröße bei der 0,7-fachen Vergrößerung ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, da alle Aufnahmen für die Analyse der Bewegungsdynamik mit dieser Vergrößerung gemacht wurden. Bei diesem Experiment wurden drei vollständige Kalibrierungen des Mikroskops durchgeführt. Alle Kalibrierungen wurden mit der 0,7-fachen Vergrößerung des Objektivs gemacht und für jede Kalibrierung wurde die Pixelgröße 1000-mal bestimmt (siehe Abbildung 20).

Für die Mittelwerte und Standardabweichungen der Pixelgrößen ergaben sich im zweiten Experiment die folgenden Werte:

- i) Kalibrierung 1: $1,642 \mu\text{m} \pm 11 \text{ nm}$
- ii) Kalibrierung 2: $1,649 \mu\text{m} \pm 7 \text{ nm}$
- iii) Kalibrierung 3: $1,652 \mu\text{m} \pm 10 \text{ nm}$

Aus den drei Kalibrierungen des Mikroskops ergibt sich für die kleinstmögliche Vergrößerung des Objektivs eine mittlere Pixelgröße von **1,648 μm** . Dieser Umrechnungswert für die Größe eines Pixels wurde für alle Messungen in dieser Arbeit verwendet.

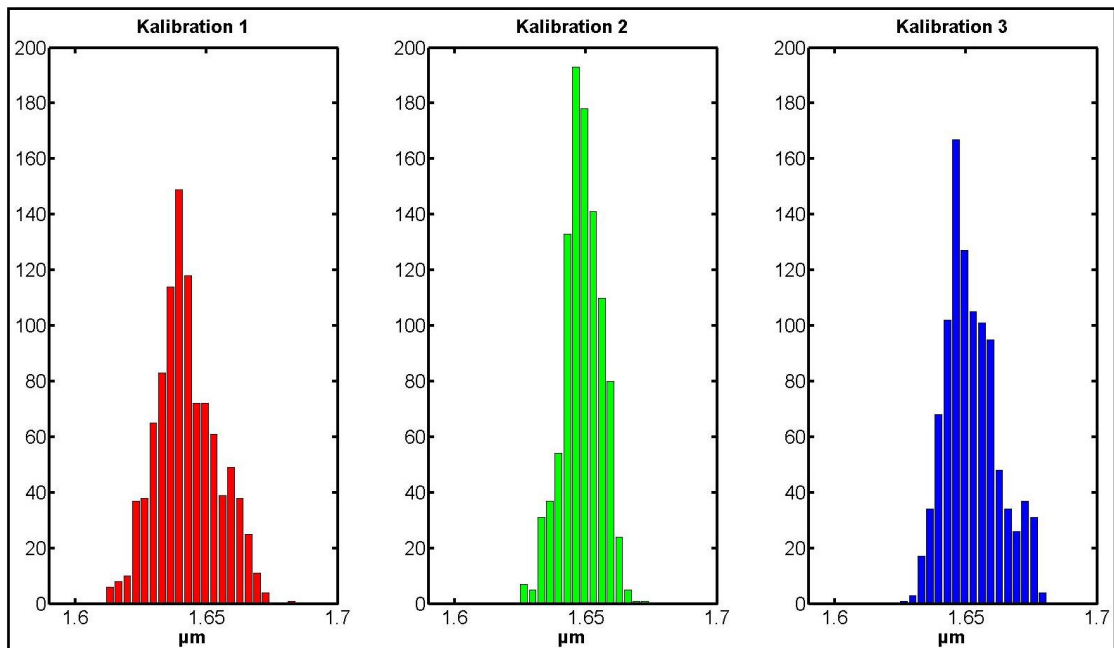


Abbildung 20: Im zweiten Experiment wurden drei Kalibrierungen des Wurmtrackers für die kleinstmögliche Zoomeinstellung (0,7x) durchgeführt. In der obigen Abbildung sind die (nicht normierten) Verteilungen der Pixelgrößen der drei Kalibrierungen zu sehen. Auch im zweiten Experiment ist die Streuung der einzelnen Messwerte äußerst gering.

Einrichten des Mikroskops

Vor Beginn jeder Messung muss der präparierte Probenhalter passend in das Durchlichtmikroskop eingesetzt werden. Dafür wird zunächst der Probenhalter so auf das Unterteil einer Petrischale ($\varnothing = 5 \text{ cm}$) gelegt, dass er nur noch an den Enden seiner beiden Längsseiten aufliegt und der Messbereich des Probenhalters mittig über dem Boden der Petrischale schwebt (siehe Abbildung 21).

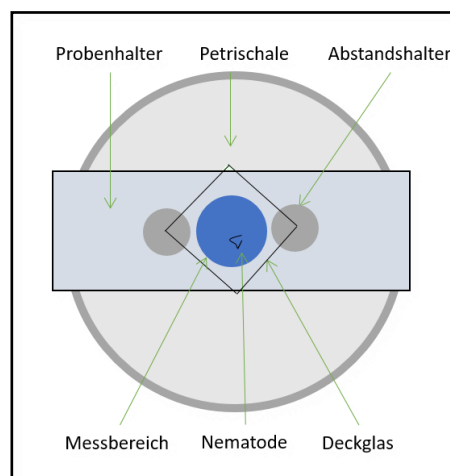


Abbildung 21: Einrichten des Probenhalters. Der präparierte Probenhalter muss vor dem Einlegen in das Mikroskop auf die Unterseite einer Petrischale gestellt werden, so dass der Messbereich (bzw. der Nematode) frei über der Plexiglasscheibe des Messtisches schwebt.

Anschließend wird die Petrischale zusammen mit dem Probenhalter auf die Plexiglasscheibe des Messtisches gestellt. Dabei muss die Petrischale so auf dem Messtisch positioniert werden, dass sich der Messbereich des Probenhalters direkt über der Lichtquelle des Wurmtrackers befindet. Dadurch wird eine optimale Beleuchtung des Messbereichs bzw. der Nematoden erreicht. Im nächsten Schritt wird der Messtisch mit der Stage solange verfahren, bis sich der Messbereich des Probenhalters direkt unterhalb des Objektivs befindet. Da die Lichtquelle in den Messtisch integriert ist und somit mit der Stage mitgefahren wird, ändert sich die eingestellte Beleuchtung des Messbereichs durch das Fahren der Stage nicht. Danach wird die Petrischale noch solange per Hand verschoben und gedreht, bis sich der zu messende Nematode im Blickfeld der Kamera befindet (siehe Abbildung 22). Dabei sollte allerdings darauf geachtet werden, dass sich nach dem manuellen Einrichten des Probenhalters der Messbereich immer noch direkt über der Lichtquelle befindet. Um einen Nematoden im Messbereich des Probenhalters zu finden, d. h. in das Blickfeld der Kamera zu bekommen, kann ein Echtzeitbild des Blickfelds am Bildschirm angezeigt werden. Bei der Auswahl des tatsächlichen Messbereichs⁸ sollte darauf geachtet werden, dass sich der Rand des verfügbaren Messbereichs nicht im Blickfeld der Kamera befindet. Beide entwickelten Probenhalter⁹ besitzen einen verfügbaren Messbereich, der groß genug ist, um dies zu vermeiden. Nachdem der Probenhalter korrekt in den Wurmtracker eingesetzt ist, kann mit der Zoomeinstellung des Objektivs die gewünschte Vergrößerung ausgewählt werden. Im Anschluss daran muss noch die Stärke der Beleuchtung an die ausgewählte Vergrößerung angepasst werden. Dies erfolgt durch das Verschieben der Plexiglasscheibe entlang des Führungsstabs, wodurch sich der Abstand zwischen dem Probenhalter und der Lichtquelle ändert (Je näher der Probenhalter an die Lichtquelle gefahren wird, desto stärker wird der Messbereich beleuchtet). Zum Schluss wird mit der Feineinstellung des Objektivs der ausgesuchte Nematode noch fokussiert.



Abbildung 22: Echtzeitbild des Blickfelds der Kamera. Zum Einrichten des Probenhalters kann ein Echtzeitbild des Blickfelds am Bildschirm des PCs angezeigt werden. Damit lässt sich der Nematode im Messbereich des Probenhalters schnell finden. In der Abbildung ist ein *C. elegans* zu sehen, der sich in einer viskoelastischen Umgebung (M9-Puffer mit 0,3 % Agarose-Anteil) bewegt.

⁸ Bereich, der während der Messung von der Kamera aufgenommen wird (Blickfeld der Kamera).

⁹ Eine ausführliche Beschreibung der beiden Probenhalter befindet sich im Kapitel 3.1.

3.4 Diskussion

Tracking-Systeme werden in der gesamten experimentellen Wissenschaft verwendet, da viele Experimente das Beobachten von sich bewegenden (bzw. lebenden) Objekten beinhalten (Kays, Crofoot, Jetz, & Wikelski, 2015). Beispielsweise werden Tracking-Systeme verwendet, um das Verhalten von lebenden Organismen wie Fischen, Mäusen und Fliegen näher zu untersuchen (Cleasby, et al., 2015), (de Chaumont, et al., 2012), (XU & Cheng, 2017). Da diese Experimente auf unterschiedlichen Zeit- und Größenskalen stattfinden, kommen dementsprechend auch Tracker in den verschiedensten Varianten zum Einsatz.

Auch existieren bereits mehrere Tracking-Systeme, die speziell für das Tracken von Nematoden entwickelt wurden. Im Allgemeinen lassen sich diese „Wurmtracker“ in zwei Kategorien einteilen:

a) statische Wurmtracker

Statische Wurmtracker sind Tracking-Systeme, bei denen während der Messung weder die Kamera noch der Messtisch bewegt wird. D. h. es wird ausschließlich ein zuvor ausgewählter Bereich im Probenraum aufgenommen. Diese Tracking-Methode kommt häufig zum Einsatz, wenn hohe Aufnahmegeschwindigkeiten (oft mehr als 100 Bilder pro Sekunde) benötigt werden. Die hohen Aufnahmegeschwindigkeiten werden dadurch ermöglicht, da die Aufnahme und die Auswertung der Bilder getrennt voneinander (nacheinander) erfolgen können. Ein Beispiel für eine Arbeit, bei der ein (statischer) Wurmtracker mit einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit (125 Bilder pro Sekunde) verwendet wurde, ist zu finden unter: (Shen & Arratia, 2011). Auch für das Multiwurmtracking (Tracken von mehreren Nematoden gleichzeitig) werden meist statische Wurmtracker verwendet. Ein Beispiel hierfür ist zu finden unter: (Swierczek, Giles, Rankin, & Kerr, 2011)

b) dynamische Wurmtracker

Dynamische Wurmtracker sind Tracking-Systeme, bei denen entweder die Kamera oder der Messtisch bewegt werden kann. D. h. der Tracker kann einen zuvor ausgewählten Nematoden im Blickfeld der Kamera halten. Damit lassen sich einzelne Nematoden für eine (nahezu beliebig) lange Zeit tracken. Dynamische Wurmtracker besitzen oft eine geringere Aufnahmegeschwindigkeit als statische Tracker, da ihr Aufbau (bzw. ihre Programmierung) meist komplexer ist als der von statischen Trackern. Ein Grund hierfür ist, dass für die Steuerung der Stage (im Gegensatz zu statischen Trackern) eine Bildauswertung in Echtzeit erfolgen muss. Jedoch kann dafür mit dynamischen Trackern die Bewegung der Nematoden über lange Zeiträume und große Strecken beobachtet werden. Ein Beispiel hierfür ist zu finden unter: (Geng, Cosman, Berry, Feng, & Schafer, 2004). Auch der von uns entwickelte Wurmtracker gehört in diese Kategorie.

In Abbildung 23 sind die bekanntesten Wurmtracking-Systeme aufgelistet. Um den von uns entwickelten Wurmtracker mit den dort aufgelisteten Trackern besser vergleichen zu können, wurden untenstehend einige technische Daten unseres Wurmtrackers zusammengefasst:

Aufnahmegeschwindigkeit:	30 Bilder pro Sekunde
Auflösung:	1234 x 1624 Pixel
Tracking-Variante:	Einzel- und Multiwurmtracking
xy-Stage:	Ja
max. Messbereich:	25 cm ²

Name	Worm Tracker 2.0 (Schafer lab)	Nemo (Tavernarakis lab)	The Parallel Worm Tracker (Goodman lab)	OptoTracker (Gottschalk lab)	Multimodal illumination and tracking system (Lu lab)	CoLBeRT (Samuel lab)	The Multi Worm Tracker (Kerr lab)
Single/Multi Worm	Single	Single	<50	<50	Single	Single	<120
Adaptable	Yes, supports x-y stages by three different vendors, as well as other camera systems (i.e. USB cameras)	Yes, code open for changes, supports other camera systems (i.e. USB cameras)	Yes, code open for changes, supports other camera systems (i.e. USB cameras)	Yes, code open for changes, supports other camera systems (i.e. USB cameras)	Yes, code open for changes, supports any projector and LabVIEW Vision compatible camera systems (i.e. USB cameras)	Yes, code open for changes	Yes, code open for changes, supports LabVIEW Vision compatible camera systems
Optogenetic application	No	No	No	Yes	Yes – 3 wavelengths	Yes	Yes
Illumination type	NA	NA	NA	Whole field	patterned; intensity adjustable – each wavelength independently	patterned	Whole field
X-Y Stage control	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No
Measured parameters	Skeleton and outline	Skeleton and outline	Centroid	Centroid	Skeleton and outline	Skeleton and outline	Skeleton and outline
Camera resolution/support for other resolution (pixel)	1280 × 1024/Yes	800 × 600/Yes	640 × 480/No, downsized if greater	640 × 480/No, downsized if greater	320 × 240/Yes, but reduced fps at higher resolutions	1280 × 1024 /NA	2352 × 1728/No
Camera frequency/other supported (frames per second)	30/Yes	40/Yes	15/Yes	15/Yes	25/Yes	50/Yes	31/No
Video stored	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
GUI	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Microscope required	No	No	No	No	Yes	Yes	No
Required Hardware*	X-Y Stage, camera	Camera	Camera	Camera, light source with shutter, filters	X-Y Stage, camera, projector, filters	X-Y Stage, Laser, DMD Array, frame grabber, camera	Camera, frame grabber, background light
Required software	Java, ffdshow, MATLAB or MCR	MATLAB (R13) + Image Processing Toolbox	MATLAB (R13) + Image Acquisition and Image Processing Toolbox	MATLAB (R13) + Image Acquisition and Image Processing Toolbox	LabVIEW (+ Vision)	MindControl (custom, C), MATLAB R2010a	LabVIEW (+ Vision), C++ (custom), Java
Cost estimation excluding software, computer and microscope (US\$)	3,500	350	350	1600	10,000	16,000	7,000
* Some cameras require a frame grabber and PCI card to communicate with LabVIEW or MATLAB; USB- or fire-wire cameras should work w/o these							
The authors thank Jeffrey N. Stirman for advice on assembling this table							

Abbildung 23: Vergleich unseres Trackers mit bereits vorhandenen Tracking-Systemen. In der obigen Abbildung sind einige technische Details der bekanntesten Wurmtracker aufgelistet.

Quelle: wormbook.org

Fazit:

Vergleicht man die Hardware unseres Wurmtrackers mit den oben aufgelisteten Trackern, ist es gerechtfertigt zu sagen, dass unser Wurmtracker ein echter Allrounder ist. Der von uns entwickelte Wurmtracker besitzt einen sehr großen (verfügbaren) Messbereich (25 cm^2), eine hohe Auflösung (1234 x 1624 Pixel) und eine mittlere Aufnahmegeschwindigkeit (30 Bilder pro Sekunde). Damit ist er für eine quantitative Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* bestens geeignet.

4 Software zur Datenakquise und -analyse

Für die Programmierung unseres Wurmtrackers wurde ein spezielles (neuartiges) Software-Konzept verwendet. Das Konzept basiert auf einer Kombination von Matlab (The MathWorks, Inc.) und LabVIEW (National Instruments), die über einen .m-Compiler miteinander verbunden sind. Dies ermöglichte es uns, die gesamte Programmierung von der Aufnahme über die Qualitätskontrolle bis hin zur Analyse mit einem einheitlichen Software-Konzept durchzuführen.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Programme zur Datenakquise und -analyse wurden selbstständig entwickelt und programmiert.

4.1 Ansteuerung des Wurmtrackers und Aufnahmekonzepte

Nachdem der präparierte Probenhalter in das Mikroskop eingelegt und ausgerichtet wurde, müssen noch einige Tracking-Einstellungen gemacht werden, bevor die Messung der C. elegans-Bewegung beginnen kann. Für das Finden der optimalen Tracking-Einstellungen wurde für jedes verwendete Aufnahme-Verfahren ein eigenes Tracking-Programm erstellt. Die selbst geschriebenen Programme ermöglichen es, die idealen Tracking-Einstellungen effektiv zu suchen. Hierfür wurde ein spezielles Verfahren (eingefrorenes Bild) entwickelt, mit dem die idealen Einstellungen schnell gefunden werden können. Da jedes Tracking-Programm eine Benutzeroberfläche besitzt (siehe Abbildung 32), ist sowohl die Suche nach den optimalen Einstellungen als auch die anschließende Messung einfach durchzuführen. Geschrieben sind alle Tracking-Programme mit einer Kombination aus LabVIEW und Matlab (Software-Konzept). Die Bedienung der Kamera und die gesamte Bildbearbeitung erfolgt mit Matlab, wobei die einzelnen Matlab-Skripte über LabVIEW miteinander verknüpft sind. Die Benutzeroberfläche der Tracking-Programme ist mit LabVIEW erstellt. Auch die zur Steuerung der Stage verwendete Thorlabs ATP Software ist ebenfalls in die LabVIEW-VI's mit eingebunden. Die Kommunikation der beiden Programme (Matlab und LabVIEW) verläuft über LabVIEW MathScript RT Module¹⁰.

grundlegende Tracking-Einstellungen:

Die benötigten Tracking-Einstellungen hängen teilweise von dem verwendeten Aufnahme-Verfahren ab. Aber folgende (zentrale) Einstellungen sind bei allen Aufnahme-Verfahren vor Beginn jeder Messung zu bestimmen.

Belichtungszeit:

Vor Beginn jeder Messung muss zuerst die ideale Belichtungszeit der Kamera gefunden werden (siehe Abbildung 24). Dafür muss zunächst ein Nematode in das Blickfeld der Kamera gefahren werden. Anschließend kann die Belichtungszeit mit einem Dreh- bzw. Schieberegler auf der Benutzeroberfläche des Tracking-Programms eingestellt werden. Es können dabei Werte zwischen $50 \mu\text{s}$ und $20000 \mu\text{s}$ ausgewählt werden. Der ideale Wert für die Belichtungszeit hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab:

- i) dem eingestellten Abstand zwischen Lichtquelle und Probenhalter
- ii) die ausgewählte Vergrößerung des Objektivs
- iii) das Medium, in dem sich der Nematode bewegt

¹⁰ LabVIEW MathScript RT Module ist ein (von National Instruments) entwickelter Compiler für .m-Dateien.

Ganz allgemein kann jedoch gesagt werden:

Die Belichtungszeit der Kamera muss so lange sein, dass sich die Nematoden deutlich vom Hintergrund absetzen. Allerdings dürfen die Aufnahmen auch nicht überbelichtet werden.

Für das optimale Einstellen der Belichtungszeit kann die Vorschaufunktion der Kamera verwendet werden. Dies ermöglicht es, bei jeder Änderung der Belichtungszeit die Auswirkung auf die Aufnahmen in Echtzeit am Bildschirm zu betrachten. Damit lässt sich ein idealer Wert für die Belichtungszeit schnell und einfach finden. Läuft der Nematode während dem Einstellen der Belichtungszeit aus dem Blickfeld der Kamera, kann er mit der Stage wieder zurück ins Blickfeld gefahren werden.

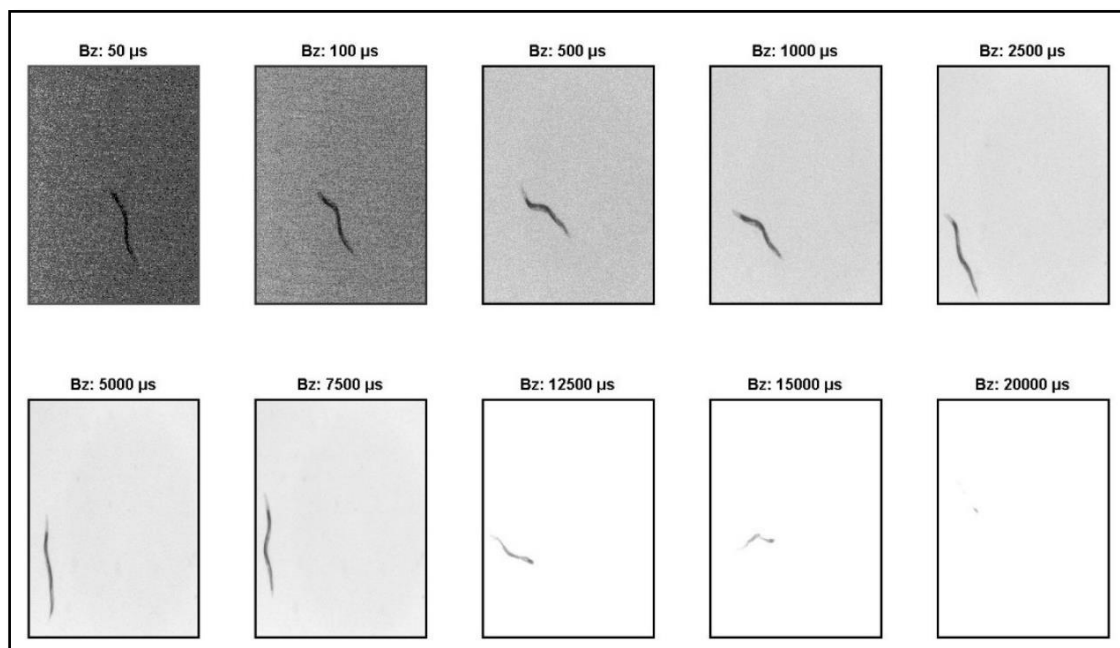


Abbildung 24: Mit einem Dreh- bzw. Schieberegler kann die richtige Belichtungszeit der Kamera (Bz) eingestellt werden. Die Belichtungszeit muss so eingestellt sein, dass der Nematode gut zu erkennen ist und sich deutlich vom Hintergrund absetzt. In den obigen Aufnahmen ist die Bewegung eines Nematoden in reinem M9-Puffer zu sehen. Die einzelnen Bilder wurden in kurzen Abständen hintereinander aufgenommen und besitzen lediglich unterschiedliche Belichtungszeiten (alle anderen Einstellungen sind identisch).

Testbild erstellen:

Ist ein guter Wert für die Belichtungszeit der Kamera gefunden, kann mit dem Button '*Bild machen*' die Vorschaufunktion der Kamera beendet werden. Wird der Button gedrückt, macht die Kamera eine Aufnahme ihres Blickfelds und überträgt diese zum PC. Wichtig dabei ist, dass sich ein Nematode im Blickfeld der Kamera befindet, wenn der Button '*Bild machen*' gedrückt wird. Mit diesem Bild können nun alle noch benötigten Tracking-Einstellungen gesucht und getestet werden. Dazu werden bei jeder Änderung der Tracking-Einstellungen die neuen Einstellungen unmittelbar und automatisch auf das (Test-)Bild angewendet und das Resultat in Echtzeit am Bildschirm angezeigt (siehe Abbildung 25). Diese Vorgehensweise hat den großen Vorteil, dass die Tracking-Einstellungen in aller Ruhe gesucht werden können. Das Kamerabild bleibt sozusagen während der Suche nach den richtigen Einstellungen „eingefroren“. Würde man zum Suchen der Tracking-Einstellungen das Echtzeitbild der Kamera verwenden, hätte man das Problem, dass der Nematode ständig aus dem Blickfeld der Kamera läuft und man müsste in diesem Fall den Nematoden erst wieder suchen und zurück ins Blickfeld fahren, bevor mit der Suche nach den idealen Tracking-Einstellungen weitergemacht werden kann. Wird

der Button *'Bild machen'* erneut gedrückt, macht die Kamera eine neue Aufnahme und überschreibt dabei die vorherige (neues Testbild). Da alle Tracking-Einstellungen bei diesem Vorgang erhalten bleiben, können somit die gemachten Einstellungen an beliebig vielen Testbildern überprüft und gegebenenfalls nachjustiert werden. Mit dem Button *'Vorschau'* kann die Vorschaufunktion der Kamera eingeschaltet werden. Im Vorschaumodus zeigt die Kamera ein Echtzeitbild ihres Blickfelds am Bildschirm an. Diese Funktion ist zum Suchen der Nematoden im verfügbaren Messbereich des Probenhalters äußerst hilfreich.

Schwellwert:

Der Schwellwert ist die zweite Tracking-Einstellung, die vor jeder Messung gemacht werden muss (siehe Abbildung 25). Da der Nematode in den Kameraaufnahmen dunkler als der Hintergrund ist (der Wurmtracker ist ein Durchlichtmikroskop), wird ein invertierter Schwellwert verwendet. D. h. alle Pixelwerte eines Bilds, die kleiner oder gleich als der Schwellwert sind, werden auf 1 gesetzt. Alle anderen Pixel erhalten den Wert 0. Das daraus resultierende Schwellwert-Bild besteht somit nur noch aus den Pixelwerten 0 und 1. Da die von der Kamera übertragenen TIFF¹¹-Bilder eine Farbtiefe von 8 Bit besitzen, sind (ganzzahlige) Schwellwerte zwischen 0 und 255 möglich. Beim Einstellen des Schwellwerts muss darauf geachtet werden, dass die Kontur des Nematoden vollständig im Schwellwert-Bild erhalten bleibt, d. h. der Schwellwert darf nicht zu klein sein. Wird jedoch ein zu großer Schwellwert eingestellt, ist eine saubere Trennung zwischen Hintergrund und dem Rand des Nematoden nicht mehr möglich. Der Schwellwert kann mit einem Drehregler auf der Benutzeroberfläche der Tracking-Programme eingestellt werden. Mit der Methode „des eingefrorenen Bilds“ lässt sich ein guter Schwellwert schnell finden, denn bei jeder Änderung des eingestellten Schwellwerts wird sofort das daraus resultierende Schwellwert-Bild am Bildschirm angezeigt.

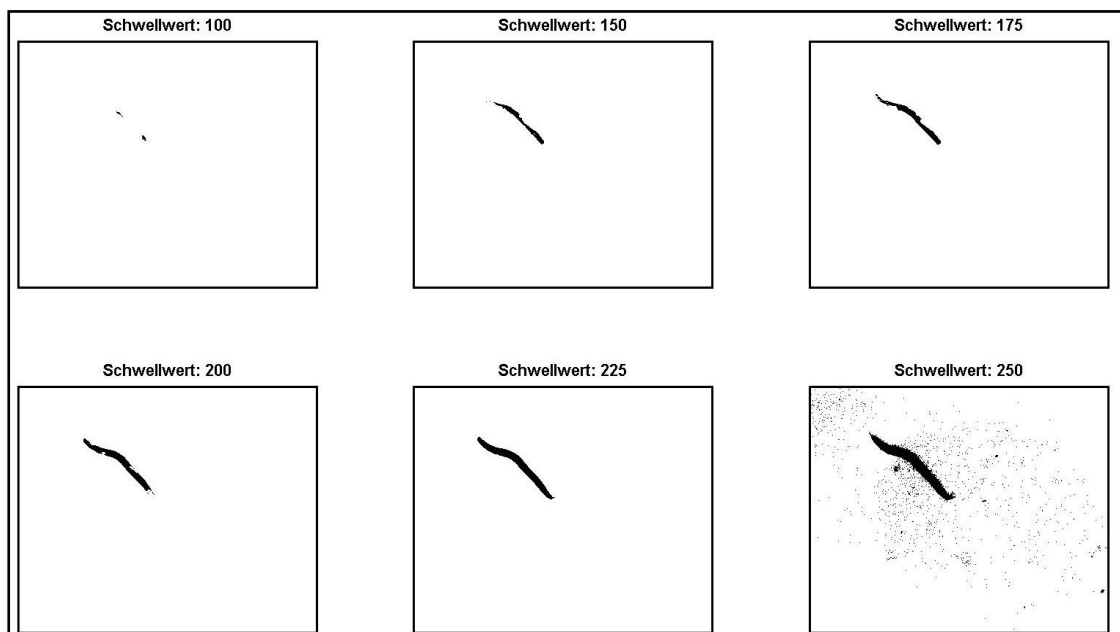


Abbildung 25: Finden des idealen Schwellwerts. In der obigen Abbildung ist das resultierende Schwellwertbild (des immer gleichen Testbilds) bei unterschiedlich eingestelltem Schwellwert zu sehen. Das Testbild zeigt einen Nematoden, der sich in reinem M9-Puffer bewegt. Da der Schwellwert mit der Methode des eingefrorenen Bilds bestimmt wird, können die Einstellungen immer am gleichen Testbild vorgenommen werden.

¹¹ Tagged Image File Format

Randkontrolle:

Nachdem der ideale Schwellwert gefunden ist, wird von den Tracking-Programmen eine Randkontrolle durchgeführt (siehe Abbildung 26). Bei dieser Kontrolle werden alle Objekte gelöscht, die den Bildrand des Schwellwert-Bilds berühren. Dafür werden zunächst alle vorhandenen Objekte im Schwellwert-Bild identifiziert. Ein Objekt im Schwellwert-Bild ist ein zusammenhängender Bereich, in dem alle Pixel den Wert 1 haben. Berührt auch nur ein Pixel des Objekts den Bildrand, so wird bei dieser Randkontrolle das gesamte Objekt gelöscht, d. h. alle Pixel des Objekts werden auf 0 gesetzt. Aufgrund dieser Kontrolle wird nur die Bewegung von denjenigen Nematoden aufgezeichnet, die sich komplett im Blickfeld der Kamera befinden. Dadurch erhält man ausschließlich vollständige Konturen der *C. elegans*, was wiederum bei der späteren Auswertung der Aufnahmen wichtig ist. Da dieser Arbeitsschritt automatisch erfolgt, müssen dafür keine Tracking-Einstellungen gesucht werden.

Größenkontrolle:

Die vierte (zentrale) Tracking-Einstellung ist die benötigte Mindestgröße eines Objekts. Alle Objekte, die kleiner als die eingestellte Mindestgröße sind, werden aus dem Schwellwert-Bild gelöscht (siehe Abbildung 26). Die Größe eines Objekts entspricht der Anzahl seiner Pixel. Durch den (zusätzlichen) Einbau einer Größenkontrolle in die Tracking-Programme wird erreicht, dass nicht jedes Objekt im Blickfeld der Kamera getrackt wird, sondern nur diejenigen Objekte, die größer als die eingestellte Mindestgröße sind. Durch diese Vorauswahl werden die Tracking-Programme beschleunigt und die spätere Auswertung wird ebenfalls vereinfacht. Beim Suchen dieser Einstellung kann wieder auf die Methode des eingefrorenen Bilds zurückgegriffen werden. D. h. die gesuchte Tracking-Einstellung kann an einem Testbild in Ruhe vorgenommen und überprüft werden. Damit lässt sich ein guter Wert für diese Tracking-Einstellung zügig finden. Die Mindestgröße kann über einen Drehregler eingestellt werden. Der eingestellte Wert sollte nur geringfügig kleiner als die Größe des zu trackenden Nematoden sein.

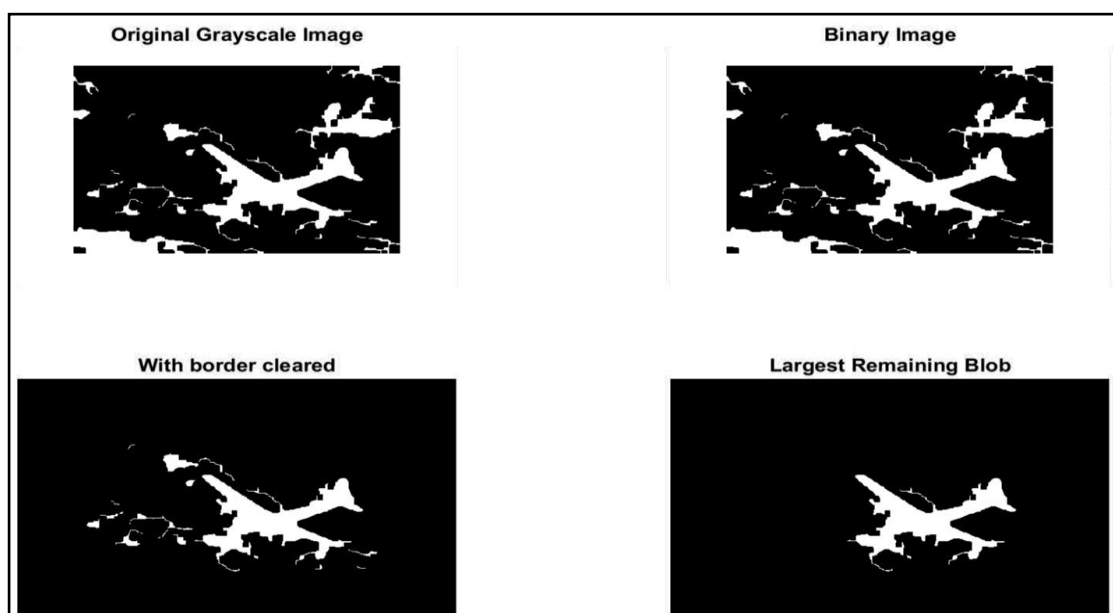


Abbildung 26: In der obigen Abbildung ist die Auswirkung der einzelnen Kontrollen auf ein Beispielbild zu sehen. Im ersten Schritt wird aus dem Originalbild (**oben links**) ein Binärbild (**oben rechts**) erstellt. Mit der anschließenden Randkontrolle (**unten links**) werden alle Objekte aus dem Bild gelöscht, die den Rand des Bilds berühren. Im letzten Schritt werden noch mit einer Größenkontrolle (**unten rechts**) alle (zu) kleinen Objekte aus dem Bild entfernt.

Quelle: mathworks.com

Daten auslesen:

Nach den Kontrollen werden im letzten Schritt der Rand und der Schwerpunkt von allen noch vorhandenen Objekten ausgelesen. In einem Ergebnis-Plot werden die Ränder und Schwerpunkte der getrackten Objekte farbig hervorgehoben über das aufgenommene Bild geplottet (siehe Abbildung 27 d). Damit kann das (End-)Ergebnis der ausgewählten Tracking-Einstellungen nochmals überprüft werden, bevor mit der eigentlichen Messung begonnen wird. Da das Resultat jeder Änderung der Tracking-Einstellungen auch in diesem Plot in Echtzeit angezeigt wird, können die ausgewählten Tracking-Einstellungen bei Bedarf nochmals nachjustiert werden. Zum Suchen der Tracking-Einstellungen ist es auch möglich, den Probenhalter mit mehreren Nematoden gleichzeitig zu präparieren. Die ausgewählten Einstellungen und Kontrollen werden allen Objekten im Bild durchgeführt und im Ergebnis-Plot angezeigt.

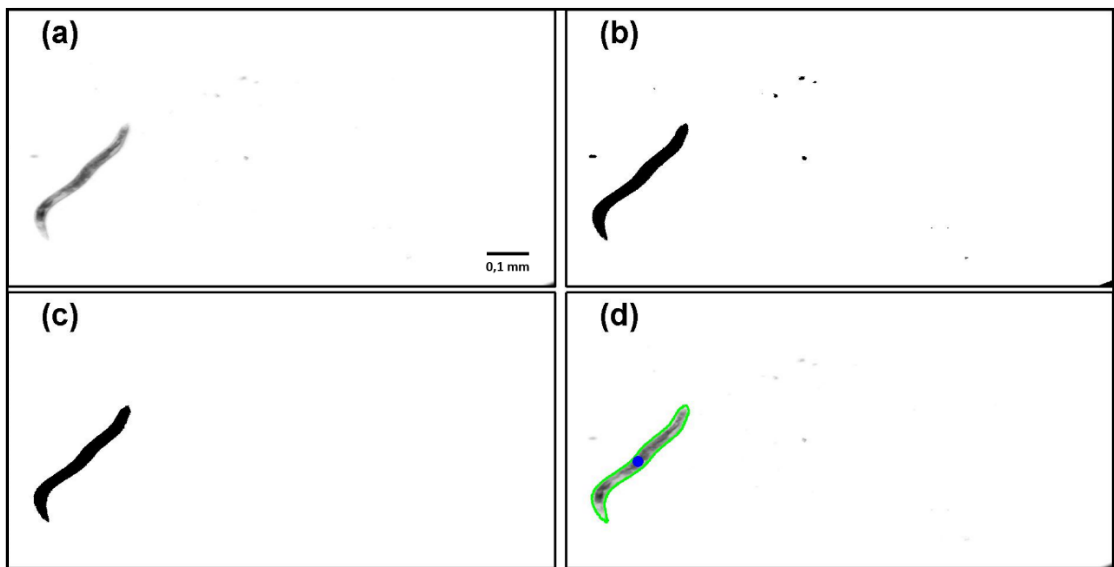


Abbildung 27: (a) aufgenommenes Testbild nach dem Einstellen der Belichtungszeit, (b) aus dem Testbild erzeugtes Schwellwert-Bild, (c) alle Objekte, die den Rand berühren oder kleiner als die Mindestgröße sind, wurden aus dem Schwellwert-Bild entfernt, (d) im Ergebnis-Plot kann das Resultat aller gemachten Tracking-Einstellungen betrachtet werden. (Der blaue Punkt ist der Schwerpunkt des Nematoden.)

Programmierprinzip der „Methode des eingefrorenen Bilds“

Mit der (selbst entwickelten) Methode des eingefrorenen Bilds lassen sich schnell gute Tracking-Einstellungen finden. Die benötigten Einstellungen können dabei bequem mit Dreh- und Schieberegler bzw. Eingabefeldern auf der Benutzeroberfläche der Tracking-Programme gesucht werden (siehe Abbildung 32). Die gemachten Einstellungen werden unmittelbar auf ein ausgewähltes Testbild angewandt und das Ergebnis wird in einem (Echtzeit-) Plot angezeigt. Der (Echtzeit-) Plot wird nach jeder Änderung der Einstellungen automatisch aktualisiert.

Um das Programmierprinzip zu verdeutlichen, soll im Folgenden ein einfaches Beispiel mit der Methode des eingefrorenen Bilds programmiert werden. Es soll die Polynomfunktion:

$$f(x) = \sum_{k=0}^N x^k \quad \text{mit } x \in [-a, a] \quad a \in \mathbb{R}; N \in \mathbb{N} \quad (7)$$

geplottet werden. Dabei soll f jedes Mal neu geplottet werden, wenn sich die Parameter N (höchste Potenz der Funktion) oder a (Definitionsbereich der Funktion) ändern. Der Parameter N wird über das Eingabefeld: 'Potenz von f ' und der Parameter a über den Drehregler: 'Definitionsbereich' auf der GUI eingestellt.

Für die Programmierung mit LabVIEW werden somit benötigt:

- Drehregler (für die Eingabe von a , GUI - Einstellung: 'Definitionsbereich')
- Eingabefeld (für die Eingabe von N , GUI - Einstellung: 'Potenz von f ')
- Matlab-Skript (zur Berechnung der Funktionswerte und zum Plotten der Funktion)
- while-Schleife (damit die Funktion beliebig oft neu berechnet werden kann)

Abbildung 28 zeigt eine Möglichkeit, das obige Beispiel mit LabVIEW und Matlab zu programmieren. In der oberen Abbildung befindet sich die GUI (Frontpanel) und unten ist das Blockdiagramm (mit dem Matlab-Skript) zu sehen.

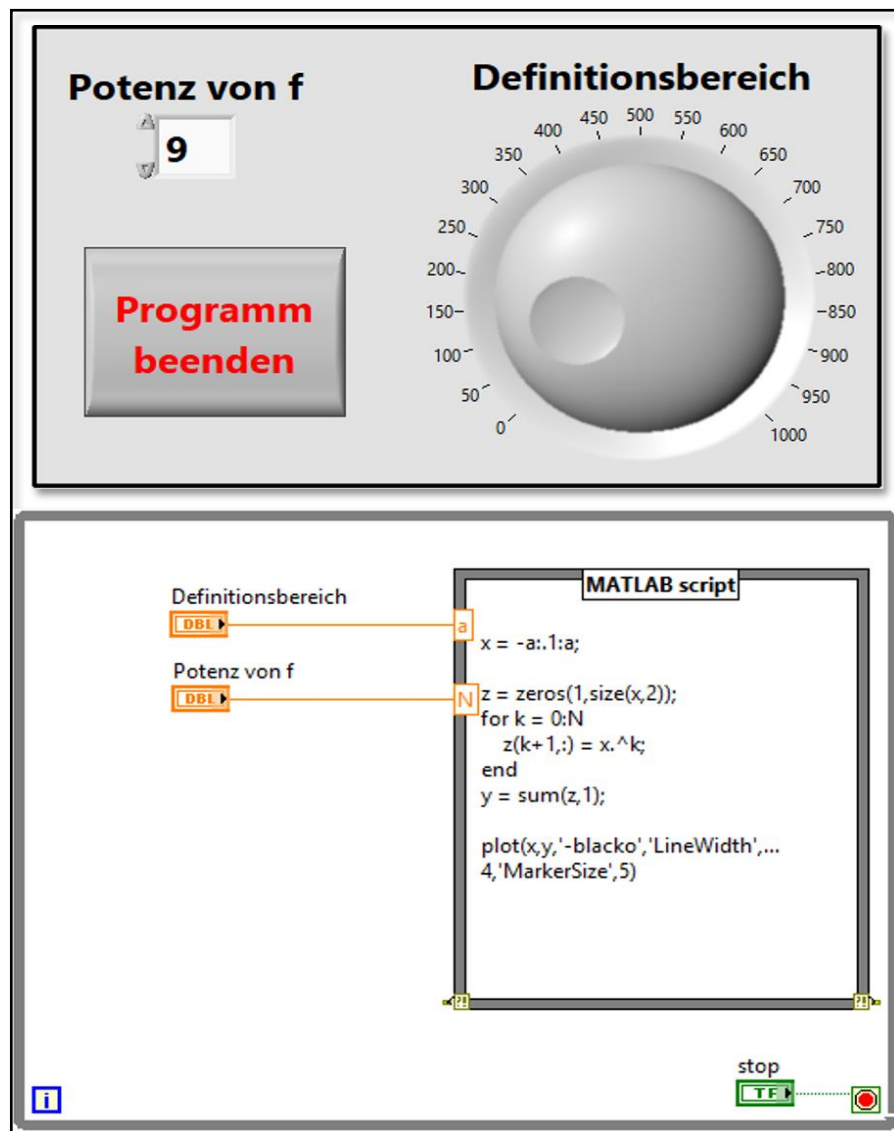


Abbildung 28: Programmierbeispiel für das Plotten einer Polynomfunktion n -ten Grades, wobei der Grad und der Definitionsbereich von f eingestellt werden können. Jede Änderung an einer der beiden Einstellungen wird sofort im Plot angezeigt. Auf der linken Seite ist die GUI des Programms und auf der rechten Seite das Blockdiagramm.

Der verwendete Compiler¹² erlaubt es, sowohl Matlab-Skripte innerhalb einer LabVIEW VI auszuführen, als auch Variablen zwischen LabVIEW und Matlab auszutauschen (orange Linien in Abbildung 28 unten). Damit können die Einstellungen: '*Definitionsbereich*' und '*Potenz von f*' mit der LabVIEW GUI gemacht werden und anschließend an Matlab (Parameter a und N) übergeben werden. Mit dem Matlab-Skript (Abbildung 29) werden dann die Funktionswerte berechnet und die Funktion geplottet.

```

1 - x = -a:.1:a;
2
3 - z = zeros(1,size(x,2));
4 - for k = 0:N
5 -     z(k+1,:) = x.^k;
6 - end
7 - y = sum(z,1);
8
9 - plot(x,y,'-blacko','LineWidth'...
10    |,4,'MarkerSize',5)

```

Abbildung 29: Matlab-Skript für die Berechnung der Funktionswerte und dem Plotten der Funktion f .

Mit der vorgestellten Methode lässt sich die Funktion f beliebig oft plotten (while-Schleife) und jede Änderung der GUI-Einstellungen wird sofort übernommen und im Plot angezeigt. Die Schwachstelle des obigen Programms ist jedoch, dass das Matlab-Skript bei jedem Durchlauf der while-Schleife erneut ausgeführt wird (egal ob sich die GUI - Einstellungen geändert haben oder nicht). Besonders bei (rechen-)aufwendigen Matlab-Skripten ist dieses Programmierprinzip problematisch. Daher wird für die Methode des eingefrorenen Bilds das obige Programm noch um zwei Elemente erweitert:

- Alle Parameter (a , N) erhalten einen Soll- und Istwert. (Damit lässt sich feststellen, ob sich eine GUI-Einstellung zwischen zwei Durchläufen der while-Schleife geändert hat.)
- Einbau einer „true-false case“-Struktur. (Dadurch wird das Matlab-Skript nur noch dann ausgeführt, wenn sich eine GUI-Einstellung geändert hat.)

Mit diesen beiden Erweiterungen und einem (leicht) erweiterten Matlab-Skript (siehe Abbildung 31) ist es möglich, das obige Programm so abzuändern, dass das Matlab-Skript nur noch dann ausgeführt wird, wenn sich eine Einstellung an der GUI ändert (siehe Abbildung 30).

Für das erweiterte Matlab-Skript wird für jeden Parameter ein Soll- und Istwert definiert. Die Sollwerte der Parameter (N_{soll} , a_{soll}) entsprechen immer den GUI – Einstellungen und werden von LabVIEW an Matlab übergeben (Eingangsvariablen). Die Istwerte der Parameter (N_{ist} und a_{ist}) werden von Matlab an LabVIEW übergeben (Ausgangsvariablen).

¹²LabVIEW MathScript RT Module von National Instruments.

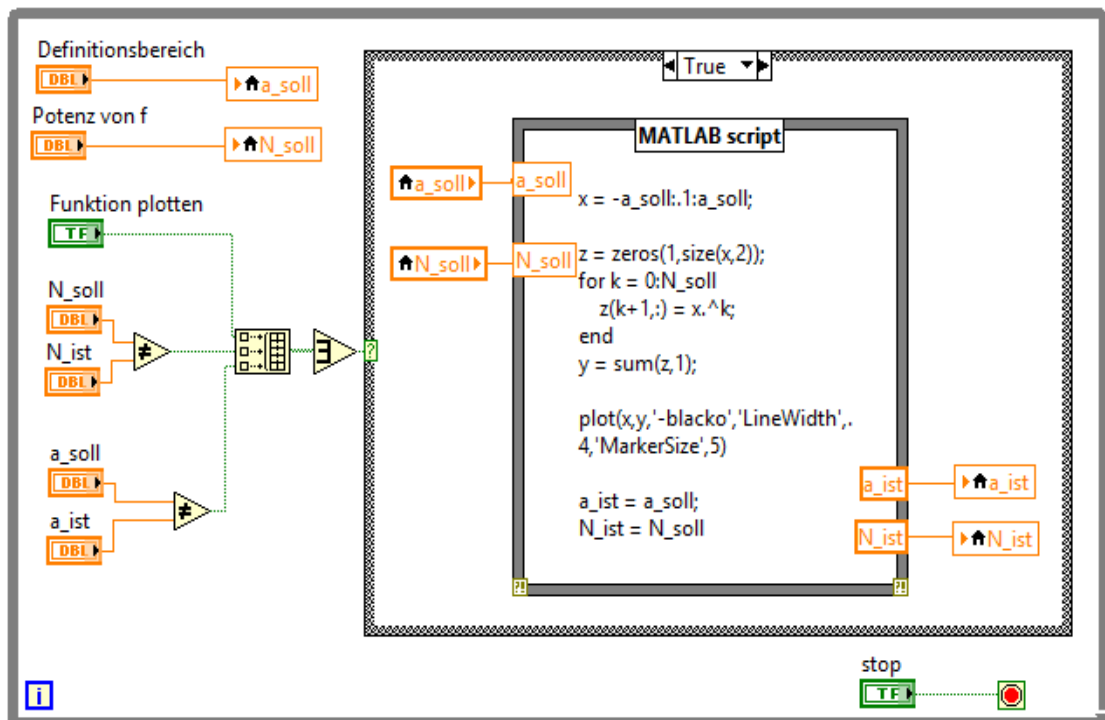


Abbildung 30: Mit der obigen Programmierung wird das Matlab-Skript nur noch dann ausgeführt, wenn sich eine GUI-Einstellung ändert, oder der Button 'Funktion plotten' gedrückt wird. Die GUI (Abbildung 28 oben) bleibt unverändert.

```

1 - x = -a_soll:1:a_soll;
2 -
3 - z = zeros(1,size(x,2));
4 - for k = 0:N_soll
5 -     z(k+1,:) = x.^k;
6 - end
7 - y = sum(z,1);
8 -
9 - plot(x,y,'-blacko','LineWidth'...
10 - ,4,'MarkerSize',5)
11 -
12 - a_ist = a_soll;
13 - N_ist = N_soll;

```

Abbildung 31: erweitertes Matlab-Skript. Das Matlab-Skript besitzt zwei Eingangsvariablen (N_{soll} , a_{soll}) und zwei Ausgangsvariablen (N_{ist} , a_{ist}).

Funktionsweise:

Wird die GUI-Einstellung 'Definitionsbereich' (bzw. 'Potenz von f') mit dem Drehregler (bzw. dem Eingabefeld) geändert, ändert sich auch der Sollwert von a (bzw. N). Damit hat der Parameter a (bzw. N) unterschiedliche Soll- und Istwerte und die Bedingung:

$$a_{soll} \neq a_{ist} \quad \text{oder} \quad N_{soll} \neq N_{ist}$$

wird wahr und der „true case“ der „true-false case“-Struktur wird von LabVIEW durchlaufen, d. h. das Matlab-Skript wird ausgeführt (siehe Abbildung 30). Die beiden Eingangsvariablen in

das Matlab-Skript (a_{soll} und N_{soll}) entsprechen immer den GUI-Einstellungen ('Definitions-bereich' und 'Potenz von f '). Am Ende des Matlab-Skripts werden die Istwerte aller Parameter gleich ihrem Sollwert gesetzt (siehe Abbildung 31). D. h. nachdem das Matlab-Skript ausgeführt wurde, sind die Soll- und Istwerte aller Parameter gleich. Somit gilt:

$$a_{soll} = a_{ist} \quad \text{und} \quad N_{soll} = N_{ist}$$

Damit wird beim nächsten Durchlauf der while-Schleife der „false case“ der „true-false case“-Struktur ausgeführt. Der „false case“ der Struktur ist leer, d. h. LabVIEW macht nichts. Solange die GUI-Einstellungen 'Definitions-bereich' bzw. 'Potenz von f ' nicht geändert werden, wird das Matlab-Skript nicht mehr ausgeführt. Erst wenn die Einstellungen geändert werden, gilt wieder $a_{soll} \neq a_{ist}$ (bzw. $N_{soll} \neq N_{ist}$) und das Matlab-Skript wird erneut (einmal) ausgeführt. Mit dieser Vorgehensweise erkennt LabVIEW nicht nur ob sich eine Einstellung geändert hat, sondern erkennt auch, ob diese Änderung bereits von Matlab bearbeitet wurde (d. h. bei jeder Änderung der Einstellungen wird das Matlab-Skript nur einmal ausgeführt). In das obige Programm wurde zusätzlich der Button 'Funktion plotten' eingebaut (, ausschließlich um die Funktionsweise eines Buttons zu demonstrieren). Jedes Mal, wenn der Button gedrückt wird, wird die Funktion f neu geplottet (bzw. das Matlab-Skript ausgeführt). Erweitert man das obige Programm noch um eine Rahmenstruktur, so können beim Start des Programms (bevor das Programm in die while-Schleife geht) unterschiedliche Soll- und Istwerte für die Parameter gesetzt werden, d. h. beim ersten Durchlauf der Schleife wird das Matlab-Skript ausgeführt (bzw. die Funktion geplottet), ohne dass vorher erst eine GUI-Einstellung geändert (bzw. der Button 'Funktion plotten' gedrückt) werden muss.

Die verschiedenen Aufnahme-Verfahren:

Das oben beschriebene Software-Konzept erlaubte es uns, verschiedene Aufnahme-Verfahren für die Bewegungsanalyse von *C. elegans* zu entwickeln. Insgesamt wurden drei unterschiedliche Aufnahme-Verfahren verwendet, wodurch die Bewegung der Nematoden auf unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen analysiert werden konnte. Die Aufnahmeverfahren unterscheiden sich im Wesentlichen in drei Punkten voneinander:

- i) die Anzahl an Aufnahmen, die pro Sekunde gemacht werden können
- ii) die maximale Dauer einer einzelnen Tracking-Sequenz
- iii) die Größe des Messbereichs

Für jedes Aufnahme-Verfahren wurde ein eigenes (spezielles) Tracking-Programme geschrieben. Die einzelnen Trackingprogramme sind jedoch in ihrer Funktionsweise und in ihrem Aufbau miteinander vergleichbar. Dadurch gibt es keine großen Unterschiede bei der Arbeit mit den unterschiedlichen Programmen.

Aufnahme-Verfahren I – Tracken mit direkter Bildauswertung

Bei diesem Aufnahme-Verfahren wird die Bewegung der Nematoden durch einen zuvor ausgewählten Messbereich aufgezeichnet (statisches Tracking). Die Bedienung des Tracking-Programms erfolgt über eine eigens entwickelte Benutzeroberfläche (siehe Abbildung 32).

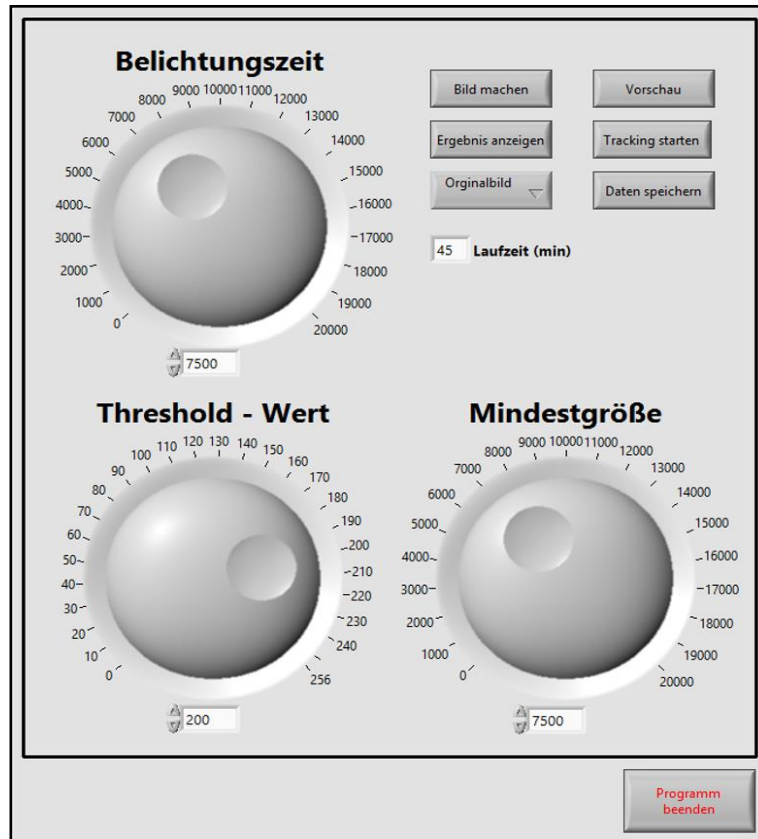


Abbildung 32: Benutzeroberfläche des Tracking-Programms für das Aufnahme-Verfahren I. Mit den drei großen Drehreglern können die benötigten Tracking-Einstellungen bequem gesucht und eingestellt werden. Sind alle Tracking-Einstellungen gemacht, muss dem Programm nur noch die Laufzeit mitgeteilt werden, bevor mit dem Button 'Tracking starten' die Messung beginnen kann. Wird der Button gedrückt, startet die Messung und der Button ändert sich in den Button 'Tracking beenden' und beginnt zu blinken. Damit kann die Messung vor Ende der eingestellten Laufzeit angehalten werden, ohne dass die bereits aufgenommenen Daten dabei verloren gehen. Wird im Gegensatz dazu der Button 'Programm beenden' gedrückt, wird das Programm beendet und alle nicht gespeicherten Daten werden gelöscht. (Blockschaltbild befindet sich im Anhang).

Zu Beginn jeder Messung wird der präparierte Probenhalter mit der Stage so lange verfahren, bis sich der gewünschte Messbereich im Blickfeld der Kamera befindet. Anschließend kann mit der Feineinstellung des Objektivs der ausgewählte Messbereich fokussiert werden. Da die verwendete Kamera eine Auflösung von 1234×1624 Pixeln besitzt, hat der Messbereich bei einer 0,7-fachen Vergrößerung eine Abmessung von ca. $2,0 \text{ mm} \times 2,7 \text{ mm}$ (1 Pixel entspricht $1,648 \mu\text{m}$, siehe Kapitel 3.3). Nachdem die Messung gestartet wurde, wird zunächst „gewartet“, bis sich ein Nematode in den Messbereich bewegt. Jedes Mal, wenn ein Nematode den Messbereich betritt, wird er so lange aufgenommen, bis er diesen Bereich wieder verlässt. Während der gesamten Messung bleibt die Kamera auf den ausgewählten Messbereich gerichtet, d. h.

weder die Kamera noch der Probenhalter werden bewegt. Der Nematode kann den ausgewählten Messbereich beliebig oft durchqueren, beziehungsweise sich beliebig lange darin aufhalten. Daher besteht jede Messung aus lauter einzelnen Tracking-Sequenzen von unterschiedlicher Dauer (siehe Abbildung 33). Eine Tracking-Sequenz wiederum besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Aufnahmen, in denen sich immer der gleiche Nematode befindet. Der Nematode muss in allen Aufnahmen einer Tracking-Sequenz präsent sein. Daher gilt:

Immer wenn ein Nematode in das Blickfeld der Kamera kommt, beginnt eine neue Tracking-Sequenz. Diese Sequenz endet, wenn der Nematode das Blickfeld der Kamera wieder verlässt.

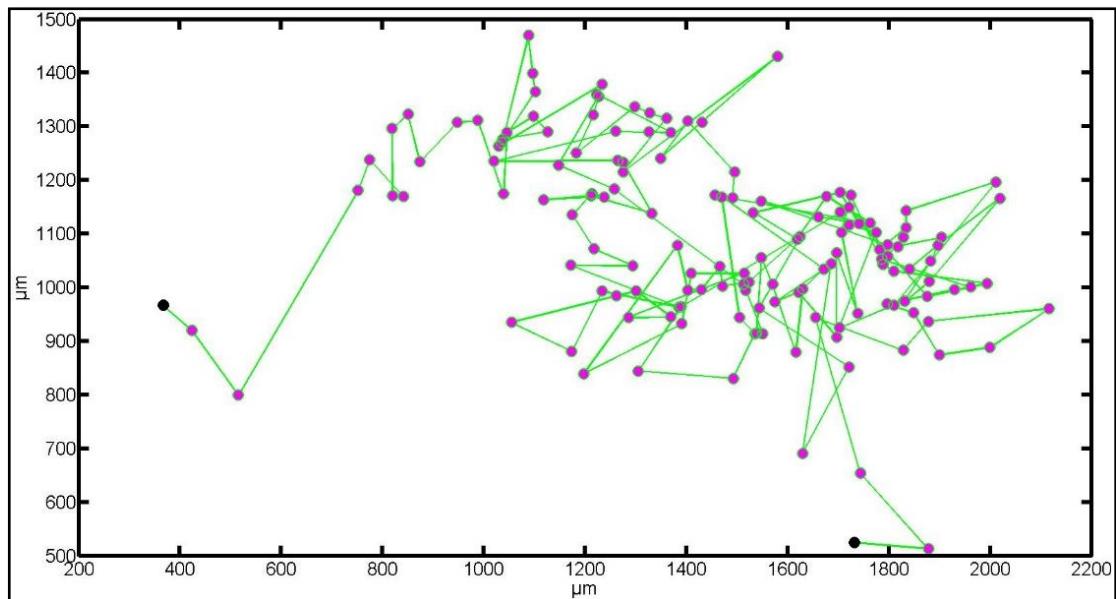


Abbildung 33: Beispiel einer einzelnen Tracking-Sequenz (aufgenommen in reinem M9-Puffer). Eine Messung mit dem Aufnahme-Verfahren I besteht aus lauter einzelnen Tracking-Sequenzen unterschiedlicher Länge. In der obigen Abbildung sind die Mittelpunkte (violette Punkte) und die Bahnkurve (grüne Linie) eines Nematoden eingezeichnet, der den Messbereich durchquert. (Die beiden schwarzen Punkte sind der Beginn und das Ende der Sequenz.)

Arbeitsweise des Tracking-Programms:

Ist der präparierte Probenhalter in das Mikroskop eingelegt und sind alle Tracking-Einstellungen gefunden, muss dem Programm nur noch die Laufzeit der Messung mitgeteilt werden. Mit dem Button '*Tracking starten*' wird die Messung gestartet und die Kamera macht eine Aufnahme des Messbereichs (Blickfeld der Kamera) und überträgt diese zur Auswertung an den PC. Im ersten Schritt der Bildbearbeitung wird aus dem übertragenen Bild ein Schwellwert-Bild erstellt. Anschließend werden alle Objekte, die den Rand berühren (Randkontrolle) oder nicht die erforderliche Mindestgröße besitzen (Größenkontrolle), aus dem Schwellwert-Bild gelöscht. Für die Aufnahme und Bildbearbeitung werden die an den Drehreglern eingestellten Werte (Belichtungszeit, Schwellwert, Mindestgröße) verwendet. Bei diesem Aufnahme-Verfahren ist die Änderung der Tracking-Einstellungen während einer laufenden Messung nicht möglich, d. h. zum Nachjustieren der ausgewählten Tracking-Einstellungen muss die laufende Messung angehalten und wieder neu gestartet werden. Ist nach der Bildbearbeitung kein Objekt mehr im Schwellwert-Bild vorhanden, macht die Kamera eine neue Aufnahme und die Bildbearbeitung beginnt von vorne. Alle Objekte, die sich nach der Rand- und Größenkontrolle

noch im Schwellwert-Bild befinden, werden vom Programm getrackt. Ein Objekt „zu tracken“ bedeutet, dass von diesem Objekt die folgenden Daten ermittelt werden:

- i) die Koordinaten der Randpunkte
- ii) die Koordinaten des Schwerpunkts
- iii) die Größe des Objekts
- iv) die fortlaufende Bildnummer
- v) die verstrichene Laufzeit der Messung

Sind aus dem Schwellwert-Bild alle Daten der getrackten Objekte ausgelesen und zwischengespeichert, macht die Kamera eine neue Aufnahme und die Bildauswertung beginnt von vorne. Vor jeder neuen Aufnahme wird überprüft, ob die eingestellte Laufzeit der Messung erreicht ist. Nach Ablauf der eingestellten Zeit wird die Messung automatisch beendet. Die Messung kann aber auch jederzeit vor Ablauf der eingestellten Laufzeit beendet werden. Jedes Mal, wenn die Kamera ein neues Bild an den PC überträgt, wird das vorhergehende Bild überschrieben. Vor dem Schließen des Tracking-Programms müssen die Messdaten auf der Festplatte gespeichert werden. Dazu wird der Button '*Daten speichern*' gedrückt, und es öffnet sich eine Dialogbox für die Wahl des Speicherorts. Die Messdaten werden in einem Unterordner mit Zeit und Datumsangabe am ausgewählten Ort gespeichert. Damit das Speichern der Daten nicht vergessen wird, blinkt der Button '*Daten speichern*' sobald nicht gespeicherte Messdaten vorhanden sind.

Überwachung der Messung:

Während der Messung wird fortlaufend das aktuelle Kontrollbild am Bildschirm angezeigt (siehe Abbildung 34). Befinden sich im Kontrollbild getrackte Objekte, werden die Ränder und Schwerpunkte dieser Objekte farblich hervorgehoben. Dadurch kann jederzeit überprüft werden, wie genau das Programm den Rand der getrackten Objekte erkennt und ausliest. Im Kontrollbild werden zusätzlich die Laufzeit, die fortlaufende Bildnummer und die Anzahl der bereits getrackten Objekte angezeigt

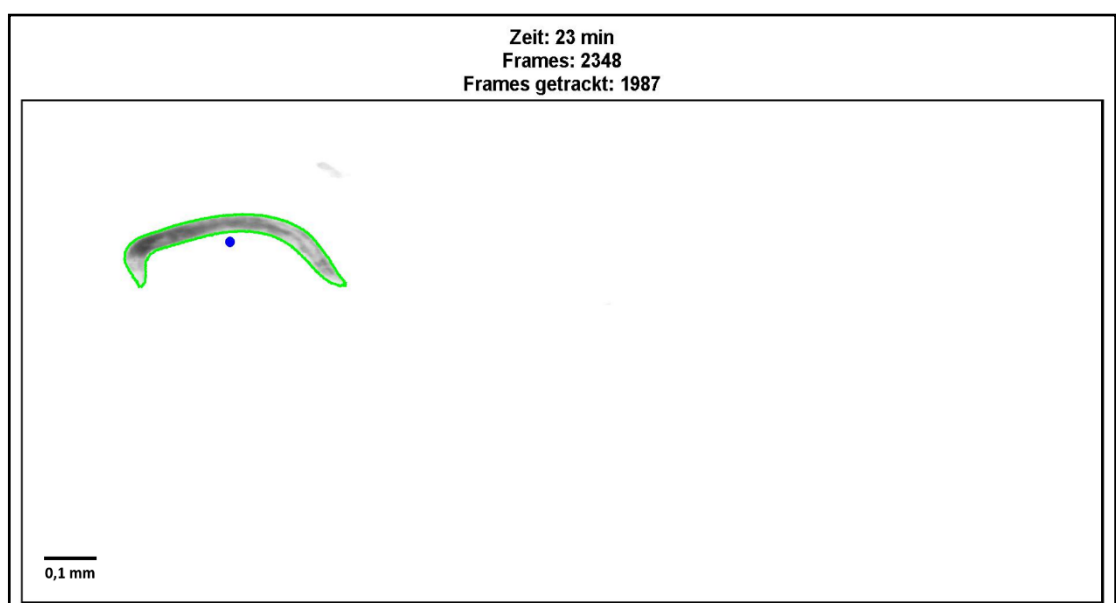


Abbildung 34: Kontrollbild zur Überwachung der Messung. Während einer Messung werden alle getrackten Objekte im Blickfeld der Kamera farblich hervorgehoben. Dadurch kann die Arbeitsweise des Programms laufend überprüft werden. Das Programm kann beliebig viele Objekte gleichzeitig tracken.

Vorteile des Aufnahme-Verfahrens I:

a) Es sind beliebig lange Tracking-Sequenzen und Messzeiten möglich

Da jedes Bild direkt nach seiner Aufnahme an den PC übertragen und sofort ausgewertet wird, müssen die aufgenommenen Bilder nicht im Arbeitsspeicher zwischengespeichert werden, sondern es müssen lediglich die ausgelesenen Daten der getrackten Objekte zwischengespeichert werden. Hinzu kommt noch, dass zum Zwischenspeichern der Arbeitsspeicher des PCs verwendet werden kann. Dadurch ergeben sich (nahezu) keine Einschränkungen für die maximal mögliche Laufzeit einer Messung (und für die Länge einer einzelnen Tracking-Sequenz).

b) Es können beliebig viele Nematoden gleichzeitig getrackt werden:

Bei diesem Aufnahme-Verfahren werden alle sich im Messbereich befindenden Nematoden gleichzeitig getrackt. Dies wird durch eine spezielle Programmierung des Tracking-Algorithmus ermöglicht (siehe Anhang: Matlab-Skripte). Dadurch kann mit nur einer einzigen Messung die Bewegung von mehreren Nematoden aufgezeichnet werden.

c) Es kann mit den optimalen Tracking-Einstellungen getrackt werden:

Da die Messung ausschließlich in einem zuvor festgelegtem (Mess-)Bereich stattfindet, bleiben viele äußere Parameter (z. B. Helligkeit des Untergrundes) während der gesamten Messung konstant. Dies ermöglicht eine ideale Wahl der Tracking-Einstellungen und damit ein einwandfreies Auslesen der Tracking-Daten aus den einzelnen Aufnahmen.

Aufnahme-Verfahren II – Tracken mit maximaler Aufnahmegeschwindigkeit

Mit diesem Aufnahme-Verfahren können alle Nematoden, die sich im Blickfeld der Kamera aufhalten, mit der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera getrackt werden. Das Aufnahme-Verfahren II ist ebenfalls ein statisches Tracking (vgl. Aufnahme-Verfahren I) und das Tracking-Programm wird wieder über eine GUI (siehe Abbildung 35) gesteuert.

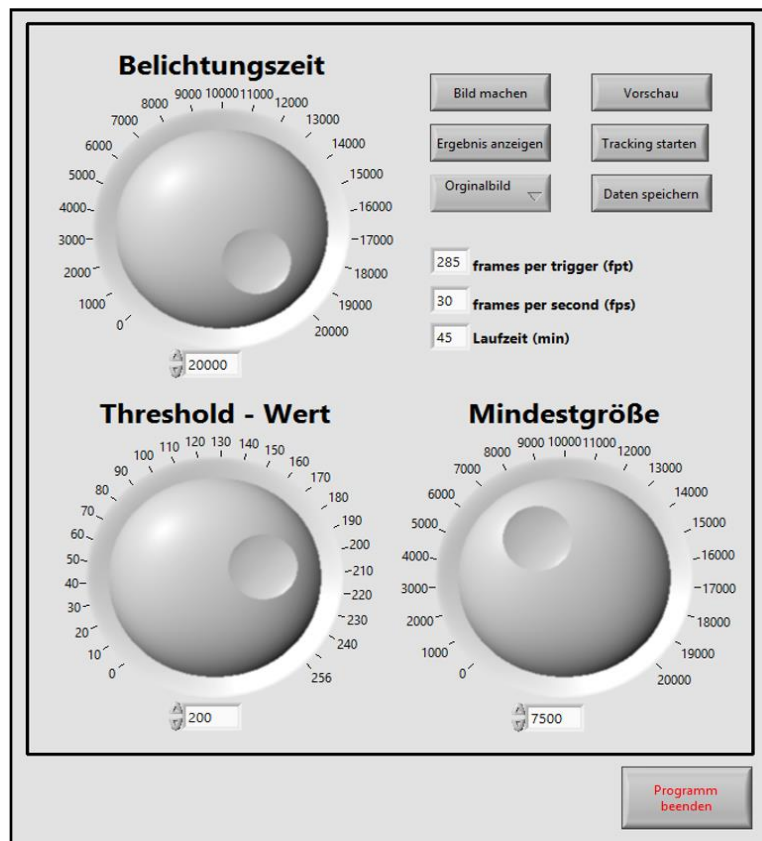


Abbildung 35: GUI des Tracking-Programms für das Aufnahme-Verfahren II. Abgesehen von den zwei zusätzlichen Eingabekästchen (fpt, fps) oberhalb der Laufzeit ist die Benutzeroberfläche des Tracking-Programms mit der GUI des ersten Aufnahme-Verfahrens identisch. Mit den Drehreglern können die idealen Tracking-Einstellungen vor Beginn jeder Messung gesucht werden. Zusätzlich kann bei diesem Verfahren die Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera (fps) und die Anzahl an Bildern (fpt), die von der Kamera zwischengespeichert werden, eingestellt werden. Das Blockschaltbild befindet sich im Anhang

Die verwendete Kamera (AVT Manta G-201) kann mit diesem Aufnahme-Verfahren die Bewegung der Nematoden mit einer Geschwindigkeit von 30 Bildern pro Sekunde aufnehmen. Auch können die Aufnahmen mit der größtmöglichen Auflösung der Kamera (1234 x 1624 Pixel) gemacht werden (d. h. maximale Größe des Messbereichs). Für die Messung wird die Kamera auf einen beliebigen Bereich im Probenraum fokussiert und die Bewegung der Nematoden durch diesen Bereich aufgenommen (vgl. Aufnahme-Verfahren I). Bei der Präparation der Proben und dem Einsetzen des Probenhalters in das Mikroskop gibt es keine Unterschiede zum Aufnahme-Verfahren I. Auch das Speichern der aufgenommenen Daten erfolgt wieder mit dem Button 'Daten speichern'. Jedoch müssen bei diesem Verfahren vor Beginn der Messung noch zwei weitere Tracking-Einstellung festgelegt werden:

i) Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera (fps¹³)

Mit dieser Einstellung wird die Anzahl an Bildern bestimmt, die pro Sekunde von der Kamera aufgenommen werden.

ii) Anzahl an Bildern, die von der Kamera zwischengespeichert werden (fpt¹⁴)

Mit dieser Einstellung wird festgelegt, wie viele Aufnahmen im Bildzwischenspeicher der Kamera gespeichert werden, bevor sie zur Auswertung an den PC übertragen werden.

Funktionsweise des Tracking-Programms:

Wird das Programm mit dem Button '*Tracking starten*' gestartet, macht die Kamera eine Aufnahme des Messbereichs und überträgt diese zur Auswertung an den PC. Am PC wird zunächst aus dem übertragenen Bild ein Schwellwert-Bild erstellt. Anschließend werden alle Objekte, die den Bildrand berühren oder die erforderliche Mindestgröße nicht haben, aus dem Schwellwert-Bild gelöscht (Rand- und Größenkontrolle). Für die Aufnahme und Bildauswertung werden die an den Drehreglern der GUI eingestellten Werte (Belichtungszeit, Schwellwert, Mindestgröße) verwendet. Auch bei diesem Aufnahme-Verfahren muss zum Ändern der Tracking-Einstellungen die Messung angehalten werden, d. h. während einer laufenden Messung werden Änderungen an den GUI-Einstellungen vom Tracking-Algorithmus nicht übernommen. Nachdem das übertragene Bild ausgewertet wurde, hängen die nächsten Schritte vom Ergebnis der Bildauswertung ab:

a) Es befindet sich kein Objekt (mehr) im Schwellwert-Bild:

d. h. im aufgenommenen Messbereich ist im Augenblick kein Nematode. In diesem Fall macht die Kamera eine weitere Aufnahme des Messbereichs und überträgt diese direkt zur Auswertung an den PC. Diese Einzelbild-Auswertung wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Nematode in den Messbereich bewegt.

b) Es befindet sich mindestens ein Objekt im Schwellwert-Bild:

d. h. momentan halten sich Nematoden im Blickfeld der Kamera auf. Die Kamera macht nun eine ganze Serie von Aufnahmen des Messbereichs (siehe Abbildung 36) und speichert diese in ihrem eigenen Bildzwischenspeicher. Die Anzahl an Aufnahmen der Serie entspricht dem eingestellten Wert für '*fpt*' und der zeitliche Abstand zwischen zwei Aufnahmen der Serie entspricht der GUI-Einstellung '*1/fps*'. Nachdem die Kamera alle Aufnahmen der Serie gemacht hat, werden sie an den PC übertragen und ausgewertet. Bei der Bildauswertung der einzelnen Aufnahmen wird zunächst aus jedem übertragenen Bild ein Schwellwert-Bild erstellt. Anschließend werden mit einer Rand- und Größenkontrolle alle Objekte des Schwellwert-Bilds überprüft. Befinden sich nach diesen Kontrollen noch Objekte im Schwellwert-Bild, so werden diese vom Programm getrackt, d. h. es werden vom jedem Objekt die folgenden Daten aus dem Schwellwert-Bild ausgelesen:

- die Koordinaten der Randpunkte
- die Koordinaten des Schwerpunkts

¹³ fps = frames per second

¹⁴ fpt = frames per trigger

- die Größe des Objekts
- die fortlaufende Bildnummer
- die verstrichene Laufzeit

Ist im letzten Schwellwert-Bild einer Serie noch ein Objekt vorhanden, wird erneut von der Kamera eine komplette Serie des Messbereichs aufgenommen und zwischengespeichert. Die Übertragung und Auswertung der einzelnen Serienbilder erfolgt erst wieder, nachdem die Kamera alle Aufnahmen der Serie gemacht hat. Befindet sich hingegen im letzten Schwellwert-Bild einer Serie kein Objekt mehr, schaltet das Programm auf eine Einzelbild-Auswertung um. D. h. die Kamera macht nur noch eine einzige Aufnahme des Messbereichs, die direkt zur Auswertung an den PC übertragen wird. Diese Einzelbild-Auswertung erfolgt so lange, bis sich wieder Nematoden im Blickfeld der Kamera befinden und das Tracking-Programm den Auswertemodus erneut ändert.

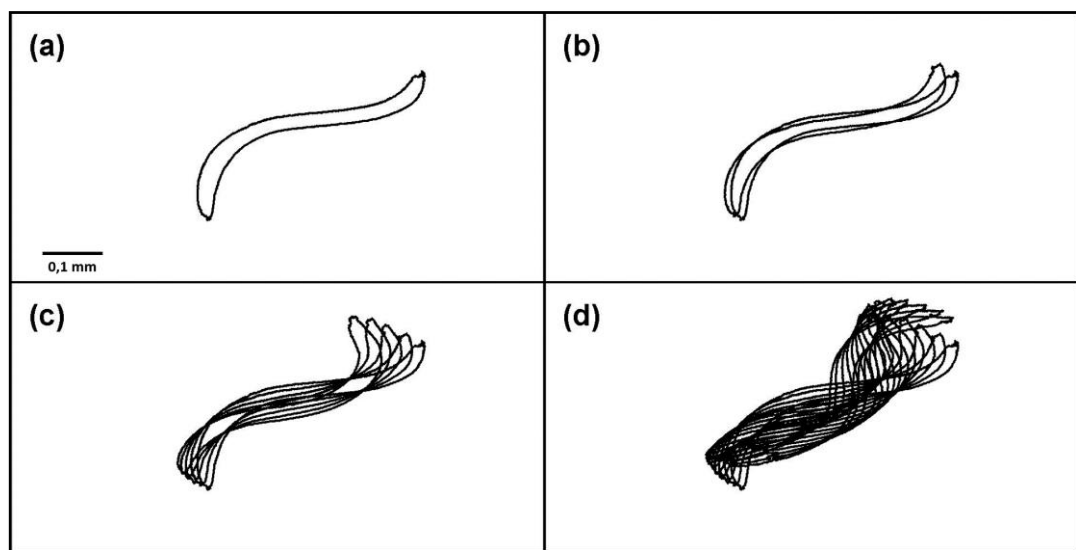


Abbildung 36: Tracking mit einer Geschwindigkeit von 30 Bildern pro Sekunde. Bei dieser Geschwindigkeit ist die Positionsänderung der Nematoden zwischen zwei Aufnahmen der Kamera nur gering. Dies ermöglicht eine genaue Beobachtung der Bewegung. (a) einzelne Kontur eines Nematoden, (b) zwei (c) fünf und (d) vierzehn aufeinanderfolgende Konturen einer Bilderserie, die mit einem zeitlichen Abstand von 1/30 Sekunden aufgenommen wurden. Die Aufnahmen zeigen die Bewegung eines *C. elegans* in reinem M9-Puffer.

Der eingebaute Bildzwischenspeicher der Kamera besitzt eine Speicherkapazität von 32 MByte. Damit können bis zu 285 Aufnahmen pro Serie mit der maximalen Auflösung von 1234 x 1624 Pixeln aufgenommen und zwischengespeichert werden. Bei einer Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera von 30 Bildern pro Sekunde ergibt sich dadurch für die maximale Dauer einer Serie: $285/30s^{-1} = 9,5$ Sekunden. D. h. nach dieser Zeit ist der Zwischenspeicher der Kamera voll und die Aufnahmen müssen zur Auswertung an den PC übertragen werden. Für die Übertragung und Auswertung einer gesamten Serie werden in etwa 3 Sekunden benötigt. Bevor die Kamera eine neue Serie aufnehmen kann, muss die vorherige Serie vollständig ausgewertet sein. Da jedoch in einer Tracking-Sequenz die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen des Nematoden immer (nahezu) gleich sein muss, ist damit die maximale Dauer einer Tracking-Sequenzen 9,5 Sekunden. Die Messungen selbst können beliebig lange Laufzeiten haben und wiederum aus beliebig vielen Tracking-Sequenzen bestehen (vgl. Aufnahme-Verfahren I). Auch bei diesem Aufnahme-Verfahren wird während der Messung ein Kontrollbild am Bildschirm angezeigt (siehe Abbildung 34). Damit kann die korrekte Arbeitsweise des Tracking-Programms fortlaufend überprüft werden.

Vorteile des Aufnahme-Verfahrens II:

- a) Die Bewegung der Nematoden kann mit der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera aufgenommen werden:**

Da alle Aufnahmen einer Serie von der Kamera zunächst zwischengespeichert werden und die Bildauswertung erst beginnt, nachdem alle Aufnahmen einer Serie gemacht wurden, ist es mit diesem Verfahren möglich, die Bewegung der Nematoden mit einer hohen Aufnahmegeschwindigkeit zu tracken.

- b) Es können mehrere Nematoden gleichzeitig aufgenommen werden:**

Auch bei diesem Verfahren werden alle Nematoden, die sich im Blickfeld der Kamera (Messbereich) befinden, gleichzeitig getrackt. Zusätzlich ist bei diesem Verfahren die Aufnahmegeschwindigkeit konstant und unabhängig von dem verwendeten Tracking-Algorithmus (und von der Anzahl der Nematoden im Messbereich).

- c) Die Messungen können mit den idealen Tracking-Einstellungen durchgeführt werden:**

Da während der Messung weder die Kamera noch der Probenhalter bewegt werden, lassen sich optimale Tracking-Einstellungen für den ausgewählten Messbereich schnell finden. Dadurch kann beim Tracking die Kontur der Nematoden gut ausgelesen werden (d. h. der Nematode kann gut vom Untergrund des Probenraus unterschieden werden).

Aufnahme-Verfahren III – Tracken über große Distanzen

Mit dem Aufnahme-Verfahren III kann die Bewegung der Nematoden über großen Distanzen untersucht werden (dynamisches Tracking). Das verwendete Tracking-Programm wird dabei wieder über eine GUI bedient (siehe Abbildung 37).

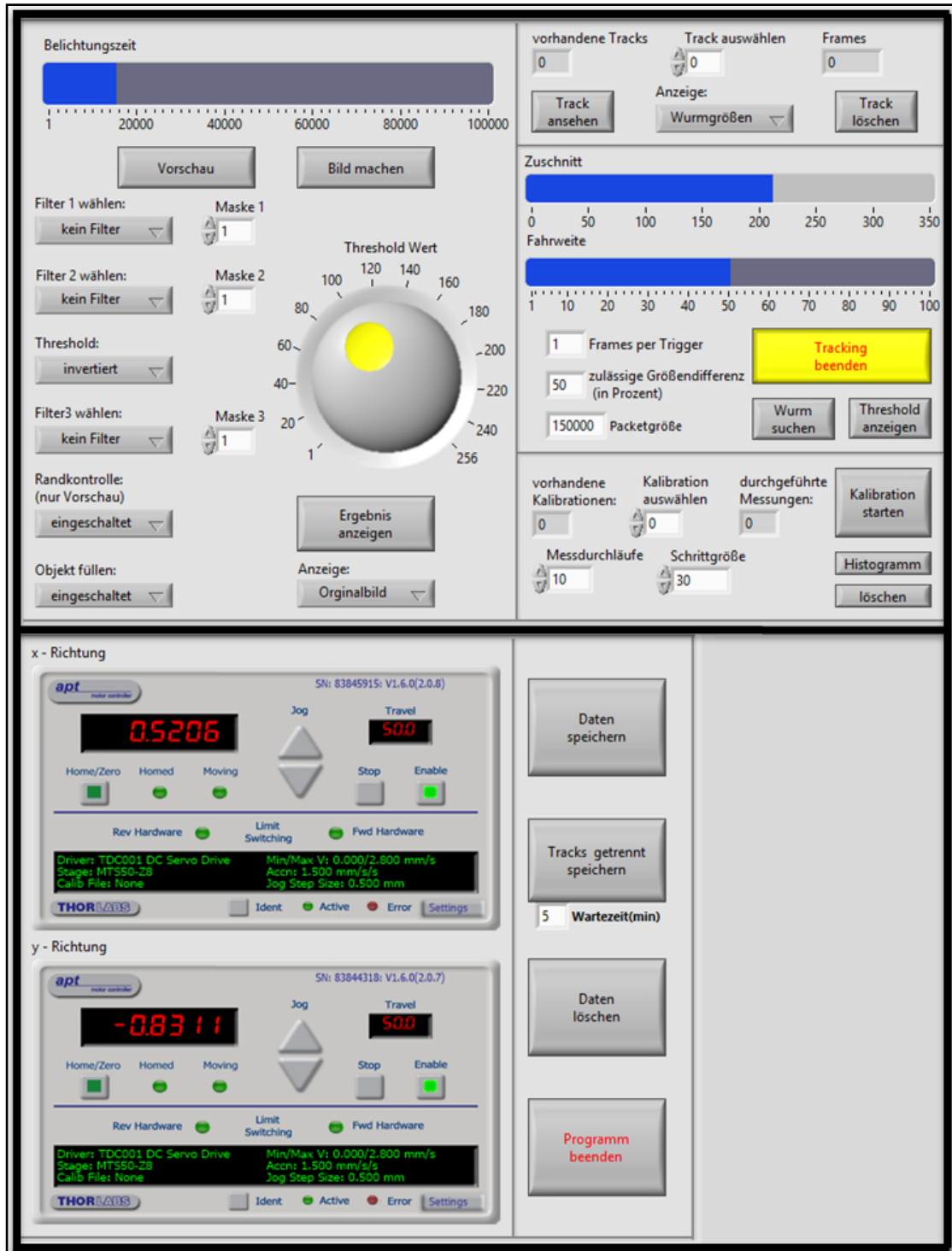


Abbildung 37: Benutzeroberfläche des Tracking-Programms. Für das Aufnahme-Verfahren III wurde die GUI des Tracking-Programms um viele Funktionen erweitert. Beispielsweise wurde die Kalibrierung des Wurmtrackers in die Benutzeroberfläche integriert. Alle zusätzlichen Tracking-Einstellungen können wieder exemplarisch an einem (Test-)Bild in Echtzeit getestet werden. In der unteren Hälfte der GUI befindet sich die Steuerung der beiden Stages. Für das Blockschaltbild des Tracking-Algorithmus siehe Abbildung 42.

Bei diesem Aufnahme-Verfahren wird während der gesamten Messung ein einzelner Nematode ständig im Blickfeld der Kamera gehalten. Dies wird durch das Fahren der Stage während der Messung ermöglicht. Die eingebaute xy-Stage kann einen 25 cm^2 großen Bereich in das Blickfeld der Kamera fahren. Um die Nematoden in einem solch großen Bereich sauber tracken zu können, wurde für dieses Verfahren die Bildbearbeitung erweitert. Alle zusätzlichen Tracking-Einstellungen, die für die Bildbearbeitung benötigt werden, können ebenfalls exemplarisch an einem „eingefrorenen Kamerabild“ in aller Ruhe gesucht und getestet werden. Wegen des (viel) größeren Probenraums wird für dieses Aufnahme-Verfahren der Probenhalter II verwendet (siehe Kapitel 3.1).

Funktionsweise des Tracking-Programms:

Wird das Programm mit dem Button 'Tracking starten' gestartet, macht die Kamera eine Aufnahme und überträgt diese zur Auswertung an den PC. Im ersten Schritt der Bildbearbeitung können zwei hintereinandergeschaltete Bildfilter auf das übertragene Bild angewendet werden. Für die beiden Bildfilter stehen mehrere Filtertypen (siehe Abbildung 38) zur Auswahl, die in jeder beliebigen Kombination und Größe¹⁵ verwendet werden können (siehe Abbildung 39). Die beiden Filter können unabhängig voneinander für die Bildbearbeitung zu- und abgeschaltet werden.

Value	Description
'average'	Averaging filter
'disk'	Circular averaging filter (pillbox)
'gaussian'	Gaussian lowpass filter.
'laplacian'	Approximates the two-dimensional Laplacian operator
'log'	Laplacian of Gaussian filter
'motion'	Approximates the linear motion of a camera
'prewitt'	Prewitt horizontal edge-emphasizing filter
'sobel'	Sobel horizontal edge-emphasizing filter

Abbildung 38: verschiedene Matlab-Bildfilter. Für die Bildbearbeitung stellt Matlab mehrere Filtertypen zur Auswahl. In der obigen Tabelle sind die zur Verfügung stehenden Matlab-Bildfilter aufgelistet. Im ersten Schritt der Bildbearbeitung können zwei dieser Filter (unabhängig voneinander) auf das übertragene Bild angewendet werden.

Quelle: mathworks.com

Nach dieser Filterkombination wird aus dem gefilterten Bild das Schwellwert-Bild erstellt. Für den Schwellwert wird der eingestellte Wert am Drehregler 'Threshold-Wert' verwendet. Bei diesem Aufnahme-Verfahren kann der Schwellwert auch während einer laufenden Messung geändert werden. Damit können lokale Schwankungen der Helligkeit im Messbereich ausgeglichen werden. Um den Schwellwert während der Messung optimal ein- bzw. nachstellen zu können, kann am Bildschirm (anstelle des Kontrollbilds) auch das aktuelle Schwellwert-Bild angezeigt werden. Auf das Schwellwert-Bild kann nochmals ein Bildfilter angewendet werden. Hierfür stehen wieder mehrere Filtertypen zur Auswahl (siehe Abbildung 38). Durch den Einbau des dritten Bildfilters ist es möglich, einen Bildfilter auf ein Binärbild anzuwenden. Der dritte Bildfilter kann ebenfalls unabhängig von den ersten beiden Filtern für die Bildbearbeitung zu- und abgeschaltet werden.

¹⁵ Größe der verwendeten Filtermaske

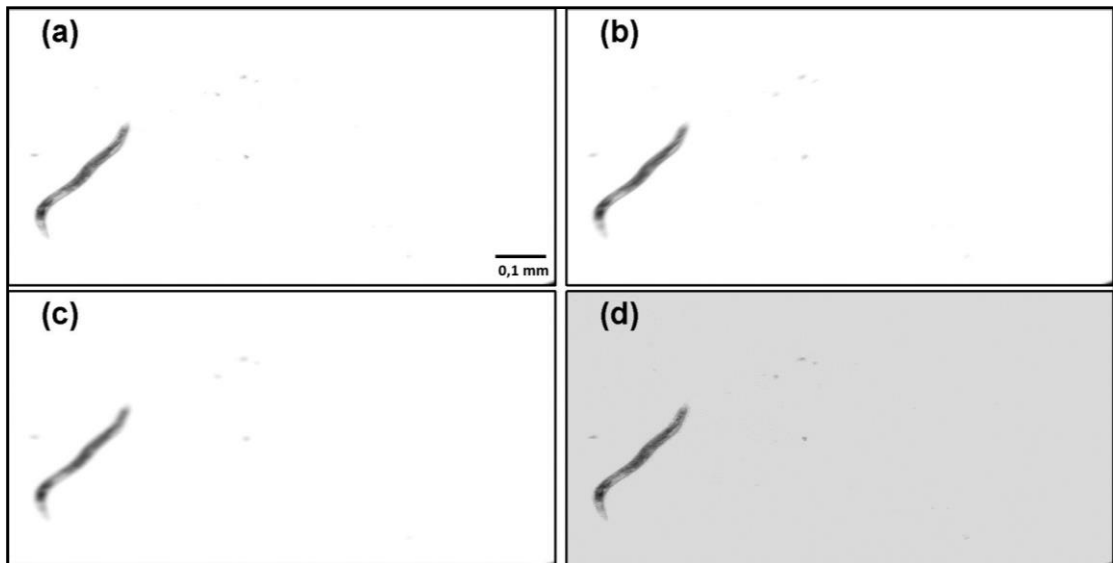


Abbildung 39: In der obigen Abbildung kann die Auswirkung von verschiedenen Bildfiltern auf das übertragene Bild betrachtet werden. Auf das Originalbild [Original Image] **(a)** wurde ein motion-Filter [Motion Blurred Image] **(b)**, ein disk-Filter [Blurred Image] **(c)** und ein unsharp-Filter [Sharpened Image] **(d)** angewendet (Matlab-Bezeichnungen für die Filtertypen). Durch den Einsatz von Bildfiltern lässt sich der Rand der Nematoden auch bei schwankender Helligkeit des Hintergrunds noch sauber auslesen.

Nach dem dritten Bildfilter werden bei der Randkontrolle alle Objekte, die den Bildrand berühren, aus dem (gefilterten) Schwellwert-Bild gelöscht. Um die genaue Größe der einzelnen Objekte zu erhalten, werden in einem Zwischenschritt alle Löcher in den Objekten des (gefilterten) Schwellwert-Bilds geschlossen. Ein Loch in einem Objekt ist ein zusammenhängender Bereich, in dem alle Pixelwerte 0 sind, der aber vollständig von einem zusammenhängenden Bereich mit den Pixelwerten 1 umschlossen ist (siehe Abbildung 40). Das „Schließen eines Lochs“ bedeutet, dass alle Pixel des Lochs von 0 auf 1 gesetzt werden. Dieser eingefügte Zwischenschritt wird benötigt, da bei diesem Aufnahme-Verfahren anstelle der Mindestgröße eine maximal zulässige Größendifferenz verwendet wird. Mit dieser maximal zulässigen Größendifferenz kann die Vorauswahl der Objekte im Schwellwert-Bild noch weiter verfeinert werden, da bei diesem Verfahren bei jeder Messung immer nur ein bestimmter Nematode getrackt wird. Das Programm erkennt dadurch sehr schnell, ob sich der gesuchte Nematode im aktuellen Schwellwert-Bild befindet.

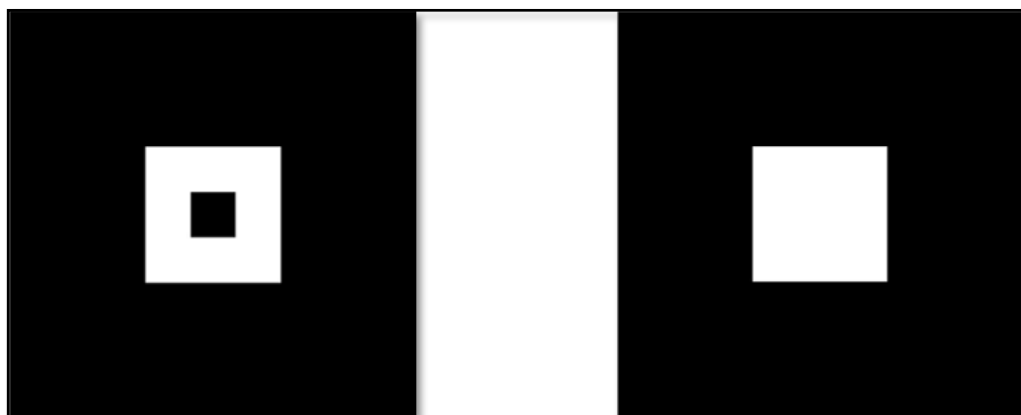


Abbildung 40: einfaches Beispiel für ein "Loch in einem Objekt". Das Objekt auf der linken Seite besitzt ein Loch in seiner Mitte (schwarzer Punkt). Der schwarze Punkt in der Mitte des Objekts ist ein Loch, da er komplett von weißen Punkten umschlossen ist. Auf der rechten Seite ist das gleiche Objekt zu sehen, nachdem sein Loch geschlossen wurde.

Die Größendifferenz berechnet sich aus dem Verhältnis der mittleren Größe des gesuchten Nematoden (ergibt sich aus den Aufnahmen, in denen der gesuchte Nematode eindeutig identifiziert wurde) und der Größe des Objekts im aktuellen Schwellwert-Bild. Ist diese Größendifferenz (in Prozent) kleiner als der eingestellte Wert, wird das Objekt als der gesuchte Nematode identifiziert. Befinden sich in einem Schwellwert-Bild mehrere Objekte unterhalb der maximal zulässigen Größendifferenz, wird jenes Objekt als der gesuchte Nematode identifiziert, das die geringste Abweichung von der mittleren Größe des Nematoden besitzt. Ist hingegen kein Objekt unterhalb der maximal zulässigen Größendifferenz, wird in dieser Aufnahme kein Objekt getrackt. In der ersten Aufnahme jeder Messung wird das größte Objekt im Schwellwert-Bild als der gesuchte (bzw. der zu trackende) Nematode bestimmt. Mit dieser Vorgehensweise kann immer der gleiche Nematode getrackt werden, auch wenn sich mehrere Nematoden im Blickfeld der Kamera aufhalten. Wird der gesuchte Nematode im Schwellwert-Bild entdeckt, werden die folgenden Daten aus dem Bild gelesen:

- die Koordinaten der Randpunkte
- die Koordinaten des Schwerpunkts
- die Fahrweite der Stage
- die Größe des Objekts
- die fortlaufende Bildnummer
- die verstrichene Laufzeit

Wurde in einer Aufnahme der gesuchte Nematode identifiziert, bestimmt die Tracking-Software seine Abmessungen und seine aktuelle Position in der Aufnahme. Dies ermöglicht es, bei der darauffolgenden Aufnahme die ROI-Funktion der Kamera zu benutzen (siehe Abbildung 41). Damit nimmt die Kamera in der nächsten Aufnahme nicht mehr ihr gesamtes Blickfeld auf, sondern nur noch einen Ausschnitt um die Position des Nematoden in der vorherigen Aufnahme. Die Aufnahme besitzt dadurch nicht mehr die Auflösung von 1234 x 1624 Pixeln, sondern je nach Größe des Nematoden eine entsprechend geringere.



Abbildung 41: ROI-Funktion der Kamera. Bei dem Aufnahme-Verfahren III wird nicht mehr das gesamte Blickfeld der Kamera aufgenommen und ausgewertet, sondern nur noch ein bestimmter Ausschnitt um den Nematoden (rotes Rechteck). Mit der ROI-Funktion der Kamera ist es möglich, nur einen Teil des Blickfelds aufzunehmen. Dies erhöht die Geschwindigkeit des Aufnahme-Verfahrens. Die Größe dieses Ausschnitts um den Nematoden herum (rotes Rechteck) kann eingestellt werden. Berührt eine Seite dieses Ausschnitts den Rand des Blickfelds (schwarzes Rechteck), wird der Nematode mit der Stage zurück in die Bildmitte gefahren. Die Länge des grünen Balkens beträgt 0,1 mm.

Die Verwendung der ROI-Funktion bietet zwei Vorteile:

a) höhere Aufnahmegeschwindigkeit

Die Aufnahmen benötigen eine kürzere Bearbeitungszeit, wodurch sich die Tracking-Geschwindigkeit des Aufnahme-Verfahrens erhöht.

b) Verwechslungen werden unwahrscheinlicher

Der gesuchte Nematode wird nicht mehr im gesamten Blickfeld der Kamera gesucht, sondern nur noch in einem sehr begrenzten Bereich. Dadurch wird die Gefahr einer Verwechslung mit einem anderen Nematoden geringer.

Da sich der Nematode ständig bewegt, ändern sich seine Position und Form zwischen zwei Aufnahmen. Aus diesem Grund müssen die Abmessungen des aufzunehmenden Bildausschnitts etwas größer sein als der exakte Bereich, in dem sich der Nematode in der vorherigen Aufnahme befunden hat. Der Bildausschnitt muss so groß sein, dass sich der Nematode vollständig darin befindet und nicht den Rand berührt (Randkontrolle). Bewegt sich beispielsweise ein Nematode sehr schnell, so ist seine Positionsänderung zwischen zwei Aufnahmen größer und dementsprechend größer muss auch der aufgenommene Bildausschnitt sein. Die Größe dieses Bildausschnitts wird mit dem Schieberegler '*Zuschnitt*' eingestellt und kann jederzeit während der Messung geändert werden. Wird in einer Aufnahme der gesuchte Nematode nicht gefunden, wird in der darauffolgenden Aufnahme die ROI-Funktion der Kamera deaktiviert, d. h. der Nematode wird im gesamten Blickfeld der Kamera gesucht. Kommt der Nematode zu nahe an den Rand des Blickfelds der Kamera, wird er mit der Stage zurück in die Mitte des Bildes gefahren. Durch das Fahren der Stage kann der ausgewählte Nematode immer im Blickfeld der Kamera gehalten werden. Dabei wird die Stage so gesteuert, dass sich der aufgenommene Bildausschnitt immer vollständig im Blickfeld der Kamera befindet. Berührt eine Seite dieses Ausschnitts den Rand des Blickfelds, wird die Stage in die entgegengesetzte Richtung gefahren. Die Stage kann gleichzeitig in x- und y-Richtung gefahren werden. Die Fahrweite der Stage (in mm) wird mit dem Schieberegler '*Fahrweite*' eingestellt.

Der Button '*Wurm suchen*':

Läuft während einer Messung der Nematode aus dem Blickfeld der Kamera, kann mit dem Button '*Wurm suchen*' die Messung vorübergehend angehalten werden. Wird der Button gedrückt, wird die Bildauswertung angehalten und die Kamera schaltet in den Vorschaumodus. Im Vorschaumodus wird ein Echtzeitbild des (gesamten) Blickfelds der Kamera am Bildschirm angezeigt. Mit der Steuerung der Stage kann der Nematode wieder ins Blickfeld gefahren werden. Die Steuerung der Stage ist in die Benutzeroberfläche des Tracking-Programms integriert. Befindet sich der Nematode wieder im Blickfeld der Kamera, kann durch erneutes Drücken des Buttons '*Wurm suchen*' die Messung wieder fortgesetzt werden.

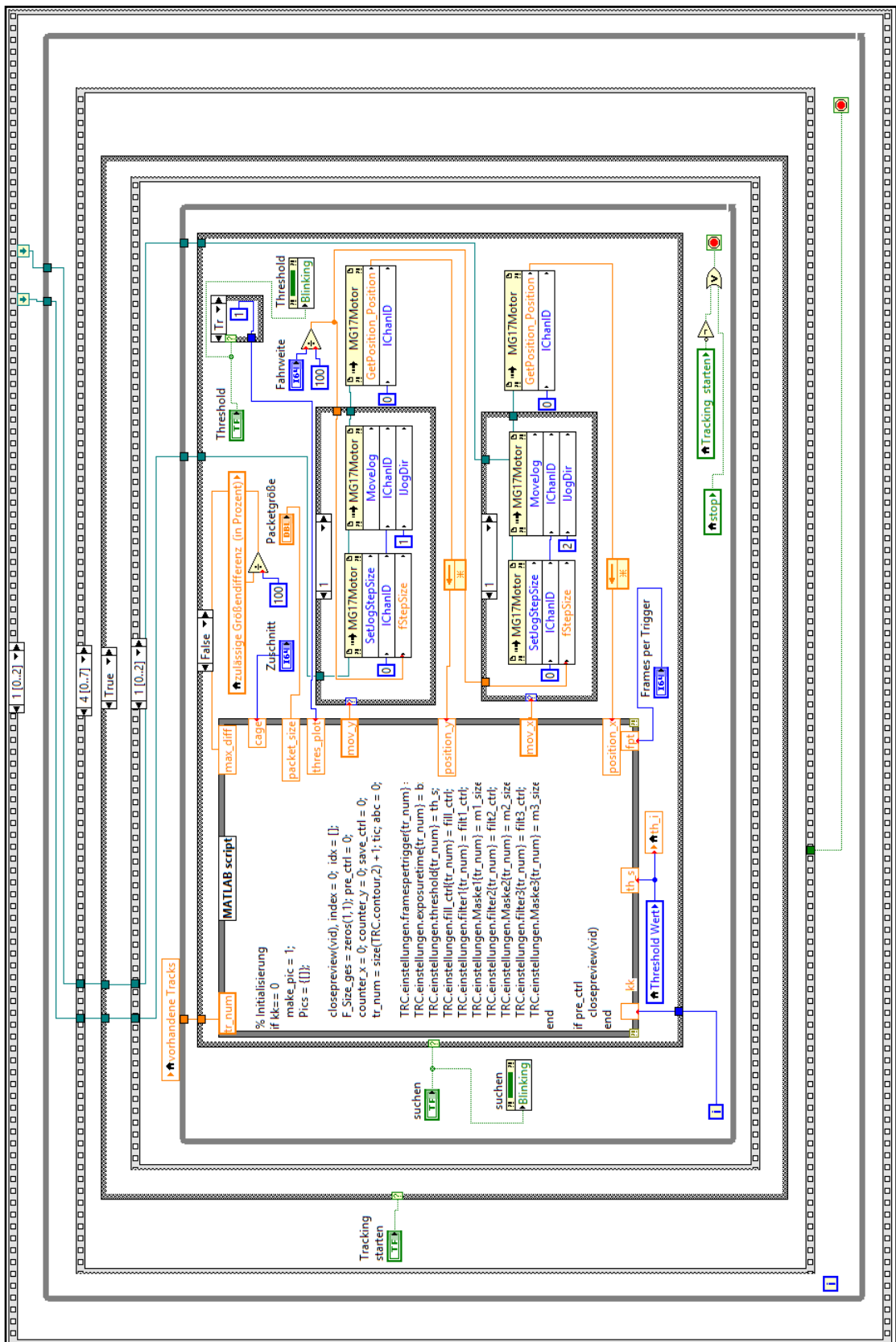


Abbildung 42: Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren III. Die obige Abbildung zeigt den Rahmen des Blockschaltbilds, in dem der Tracking-Algorithmus ausgeführt wird (innenliegende while-Schleife). Der Tracking-Algorithmus befindet sich auf der linken Seite (großer Kasten) und ist mit der Steuerung der beiden Stages (die zwei kleinen Kästen auf der rechten Seite) verbunden. Der Tracking-Algorithmus berechnet in jeder Aufnahme die Position des gesuchten Nematoden und steuert die Fahrtrichtung der beiden Stages, so dass der Nematode immer im Blickfeld der Kamera bleibt. Mit der obigen Programmierung kann der verwendete Schwellwert auch während einer laufenden Messung geändert (bzw. nachjustiert) werden.

Das Speichern von Langzeitmessungen:

Bei diesem Aufnahme-Verfahren werden die Tracking-Daten direkt aus den aufgenommenen Bildern ausgelesen und gespeichert. Da die Bilder selbst nicht mitgespeichert werden, sind (beliebig) lange Messzeiten möglich. Allerdings kann es bei Messungen von länger als 24 Stunden dennoch zu Speicherproblemen kommen, da alle Tracking-Daten in nur eine einzige Matlab-Variable geschrieben werden. Überschreiten Matlab-Variablen eine gewisse Größe, abhängig von der Matlab-Version, so können sie nicht mehr gespeichert werden. Um eventuelle Speicherprobleme von vornherein zu vermeiden, lässt sich eine maximale Anzahl an Tracking-Daten festlegen, die in eine einzige Variable geschrieben werden. Wird bei einer Langzeit-Messung diese Anzahl erreicht, werden alle folgenden Tracking-Daten in eine neue Matlab-Variable geschrieben. Für das Speichern der Daten auf der Festplatte wurde wieder der Button '*Daten speichern*' in die Benutzeroberfläche des Tracking-Programms eingebaut. Zusätzlich zu den Messdaten werden bei diesem Verfahren auch alle verwendeten Tracking-Einstellungen (Belichtungszeit, Filter, Schwellwert, ...) mitgespeichert.

4.2 Qualitätskontrolle und Segmentierung nach der Aufnahme

Nachdem die Bewegung der Nematoden mit den unterschiedlichen Aufnahme-Verfahren gemessen wurde, müssen die Tracking-Daten vor ihrer Auswertung noch kontrolliert und segmentiert werden. Diese nachträgliche Aufbereitung der Tracking-Daten wird benötigt, da die Tracking-Programme nicht explizit prüfen, ob das getrackte Objekt tatsächlich ein Nematode ist. Eine Überprüfung (und Segmentierung) während der laufenden Messung würde die Tracking-Geschwindigkeit der Aufnahme-Verfahren zu sehr reduzieren. Daher findet die Aufbereitung erst nach den Messungen statt. D. h. zunächst werden mit möglichst hoher Geschwindigkeit alle „interessanten“ Objekte im Blickfeld der Kamera aufgenommen und erst im Nachhinein aufbereitet. Die gesamte Aufbereitung besteht aus 2 Schritten (Qualitätskontrolle und Segmentierung) und ist unabhängig von dem verwendeten Aufnahme - Verfahren. Im ersten Schritt (Qualitätskontrolle) wird jedes getrackte Objekt überprüft und anschließend werden im zweiten Schritt (Segmentierung) die einzelnen Konturen der Nematoden zu Tracking-Sequenzen zusammengefasst. Für die Messungen mit dem Aufnahme-Verfahren III wird noch ein weiterer (dritter) Aufbereitungsschritt benötigt, in dem die absoluten Positionen der Nematoden bestimmt werden. Die absolute Position ergibt sich aus der Position des Nematoden im Bild und der Fahrweite der xy-Stage zum Zeitpunkt der Aufnahme.

Die zur Aufbereitung (selbst) entwickelten Programme sind in ihrer Bedienung und ihrer Funktionsweise den Tracking-Programmen sehr ähnlich. D. h. die Programme besitzen eine Benutzeroberfläche (GUI) und die zur Aufbereitung benötigten Einstellungen können exemplarisch an zuvor ausgewählten Konturen gesucht und getestet werden (Echtzeitplots). Geschrieben sind die (drei) Programme wieder mit einer Kombination aus Matlab und LabVIEW (Software-Konzept).

Qualitätskontrolle (erster Aufbereitungsschritt):

Die Aufgabe der Qualitätskontrolle ist es zu überprüfen, ob das getrackte Objekt ein Nematode ist und wurde er vollständig von der Kamera erfasst, bzw. seine Kontur sauber vom Hintergrund des Probenraums getrennt. Dazu wird die Form jedes getrackten Objekts einzeln untersucht. Bevor die Qualitätskontrolle jedoch ausgeführt werden kann, müssen zunächst einige Kontroll-Einstellungen gefunden werden. Dies geschieht nach dem gleichen Prinzip, mit dem zuvor die Tracking-Einstellungen ermittelt wurden. Das Programm besitzt eine GUI (siehe Abbildung 43) und die eingegebenen Einstellungen werden unmittelbar und automatisch auf ein ausgewähltes Objekt angewandt und das Resultat in Echtzeit angezeigt.

Arbeitsweise des Kontroll-Programms:

Als Erstes müssen die Tracking-Daten in das Programm geladen werden. Dabei spielt das bei der Messung verwendete Aufnahme-Verfahren keine Rolle. Mit dem hier vorgestellten Programm können die Messungen aller drei Aufnahme-Verfahren kontrolliert werden. Mit dem Button '*Daten laden*' können die Tracking-Daten einer Messung ausgewählt und in den Arbeitsspeicher geladen werden. Im nächsten Schritt muss dem Programm die Pixelgröße (in Mikrometer) der aufgenommenen Bilder mitgeteilt werden. Die Pixelgröße ist abhängig von der eingestellten Vergrößerung des Objektivs (und kann mit der eigens entwickelten „Kalibrierung des Mikroskops“ schnell und einfach bestimmt werden). Kennt das Programm die Pixelgröße, kann

es alle Längen der getrackten Objekte in Mikrometer umrechnen. Anschließend muss für das Suchen und Testen der Einstellungen ein Nematode ausgewählt werden. Dafür können alle getrackten Objekte der geladenen Messungen verwendet werden. Für die Auswahl wird in die GUI einfach die Bildnummer eingegeben, in der sich das Objekt befindet.

Abbildung 43: Benutzeroberfläche des Aufbereitungs- und Kontrollprogramms. Für die Qualitätskontrolle der Tracking-Daten wurde ein eigenes Programm geschrieben. Das Programm ist in seinem Aufbau und seiner Funktionsweise den Tracking-Programmen ähnlich. Die zur Aufbereitung und Kontrolle benötigten Einstellungen werden über eine GUI eingegeben und können exemplarisch an einem zuvor ausgewählten Objekt getestet werden. Sind alle Einstellungen gefunden, können alle Tracking-Daten automatisch mit diesen Einstellungen überprüft werden. (Blockschaltbild befindet sich im Anhang.)

Aufbereitung der Randpunkte:

Die Tracking-Programme lesen in jedem (Schwellwert-)Bild von allen getrackten Objekten die einzelnen Randpunkte aus (siehe Abbildung 44 oben) und speichern sie in einer $2 \times N$ -Matrix (N ist die Anzahl der Randpunkte des Objekts). In der ersten Zeile dieser Matrix stehen alle x-Koordinaten und in der zweiten Zeile stehen die dazugehörigen y-Koordinaten der einzelnen Randpunkte. Der M -te Randpunkt ist dementsprechend die M -te Spalte der Matrix. Da alle getrackten Objekte einen geschlossenen Rand besitzen, ist der Anfangs- und Endpunkt des Rands immer der gleiche Punkt.

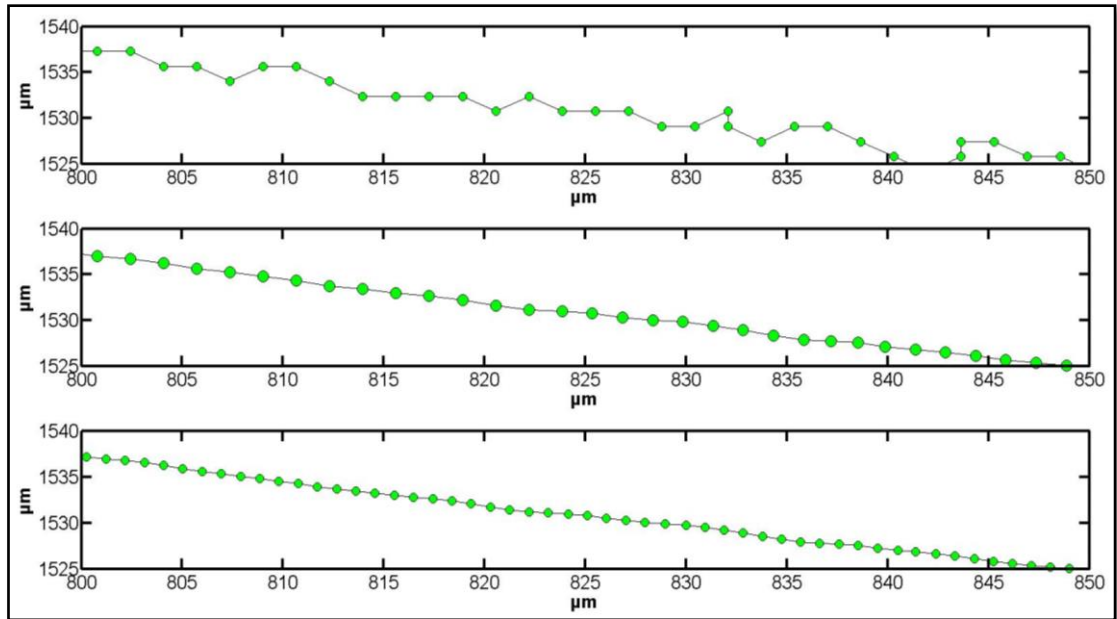


Abbildung 44: Im ersten Arbeitsschritt werden die Randpunkte des Nematoden aufbereitet. Dafür wird der aufgenommene Rand (**oben**) zuerst geglättet (**Mitte**). Anschließend wird der Abstand der einzelnen Randpunkte voneinander eingestellt (**unten**). Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des aufgenommenen Rands eines Nematoden.

a) Glättung der Randpunkte

Im ersten Schritt der Aufbereitung werden die Randpunkte des ausgewählten Nematoden geglättet (siehe Abbildung 44 Mitte). Die Glättung wird benötigt, da je nach Aufnahme-Verfahren beim Tracking oft keine Bildfilter verwendet werden und daher die getrackten Objekte meist einen kantigen Rand besitzen. Durch die Glättung werden die einzelnen Randpunkte aneinander angeglichen und die getrackten Objekte erhalten einen glatten Rand. Der M -te Punkt P_M des geglätteten Rands ergibt sich aus dem Mittelwert der Punkte P_{M-k} bis P_{M+k} , wobei die Länge k mit einem Schieberegler eingestellt werden kann. Die Berechnung des Mittelwerts wird komponentenweise durchgeführt, d. h. getrennt zwischen x- und y-Koordinaten.

Sind $X = (x_1, x_2, \dots, x_N)$ die x-Koordinaten und $Y = (y_1, y_2, \dots, y_N)$ die y-Koordinaten des Rands, ergibt sich der M -te Punkt $P'_M = (x'_M, y'_M)$ des geglätteten Rands mit:

$$x'_M = \frac{1}{2k+1} \sum_{i=-k}^k x_{M+i} \quad \text{und} \quad y'_M = \frac{1}{2k+1} \sum_{i=-k}^k y_{M+i} \quad (8)$$

Da die getrackten Objekte einen geschlossenen Rand besitzen, kann am Beginn und am Ende des Rands über den Rand hinaus geglättet werden. Dadurch besitzen der geglättete und ursprüngliche Rand die gleiche Anzahl an Punkten.

b) Abstand der Randpunkte

Im nächsten Aufbereitungsschritt wird der Abstand zwischen den einzelnen Randpunkten des Objekts eingestellt (siehe Abbildung 44 unten). Der Abstand zweier aufeinanderfolgender Randpunkte P_M und P_{M+1} ist gegeben mit:

$$d(P_M \rightarrow P_{M+1}) = \sqrt{(x_M - x_{M+1})^2 + (y_M - y_{M+1})^2} \quad (9)$$

Um diesen Abstand einstellen zu können, werden zunächst zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden Randpunkten zusätzliche Punkte eingefügt (siehe Abbildung 45). Die Position dieser Zwischenpunkte wird mittels linearer Interpolation bestimmt. Die Anzahl an zusätzlichen (Rand-)Punkten, die zwischen jeweils zwei ursprüngliche Randpunkte eingefügt werden, kann eingestellt werden.

Nach dem Einfügen dieser zusätzlichen Punkte auf dem Rand des Objekts ergeben sich die neuen Randpunkte aus denjenigen Punkten (ursprüngliche oder zusätzlich eingefügte Punkte), die den eingestellten Abstand d_{GUI} voneinander haben. Hierfür werden die Abstände $d(P_1 \rightarrow P_i)$ des ersten Randpunkts P_1 zu seinen nachfolgenden Punkten P_i mit $i = 2, 3, 4, \dots$ berechnet. Wird der berechnete Abstand zum ersten Mal größer als der eingestellte Abstand, d. h. $d(P_1 \rightarrow P_i) \approx d_{GUI}$, ist der entsprechende Punkt P_i der zweite Randpunkt P_2 . Um anschließend den dritten Randpunkt P_3 zu finden, werden die Abstände $d(P_2 \rightarrow P_i)$ mit $i = 3, 4, 5, \dots$ berechnet. Der dritte Randpunkt P_3 ist dann folglich derjenige Punkt P_i , dessen Abstand zum Randpunkt P_2 den eingestellten Wert hat, d. h. $d(P_2 \rightarrow P_3) \approx d_{GUI}$. Mit dieser Methode werden Punkt für Punkt alle neuen Randpunkte des Objekts bestimmt. Dadurch können die Abstände der Randpunkte einander angeglichen und auf jeden beliebigen Wert eingestellt werden.

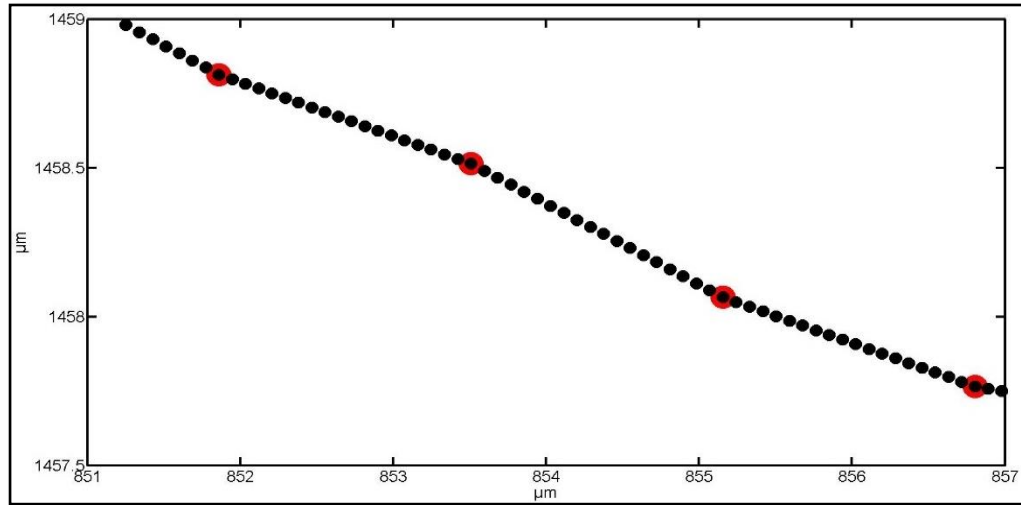


Abbildung 45: zusätzliche Randpunkte. In der obigen Abbildung ist ein Ausschnitt des Rands eines getrackten Nematoden zu sehen. Die (vier) roten Punkte sind die vom Tracking-Programm ausgelesenen Randpunkte. Die schwarzen Punkte wurden mittels linearer Interpolation zwischen jeweils zwei ursprünglichen Randpunkten eingefügt. Die neuen Randpunkte des Objekts ergeben sich aus denjenigen Punkten, (schwarze oder rote Punkte) die den eingestellten Abstand voneinander haben.

Suchen von Kopf und Schwanz

Nachdem der Rand des Nematoden aufbereitet wurde, werden im nächsten Arbeitsschritt die beiden Enden des Nematoden (Kopf und Schwanz) gesucht. Hierfür werden zunächst die Differenzvektoren eines beliebigen Randpunkts definiert. Ist $P_M = (x_M, y_M)$ der M -te Randpunkt, so ist der erste Differenzvektor des Punkts P_M gegeben mit:

$$\vec{v}_{M_1} = P_{M+k} - P_M \quad (10)$$

, wobei k die Differenzlänge ist. Der zweite Differenzvektor des Punkts P_M ist:

$$\vec{v}_{M_2} = P_{M+2k} - P_{M+k} \quad (11)$$

Nach diesem Prinzip lassen sich jedem Punkt P_M beliebig viele Differenzvektoren \vec{v}_{M_i} mit $i = 1, 2, 3, \dots$ zuordnen (siehe Abbildung 46). Für den i -ten Differenzvektor des Punkts P_m (mit der Differenzlänge k) gilt:

$$\vec{v}_{M_i} = P_{M+ik} - P_{M+(i-1)k} \quad (12)$$

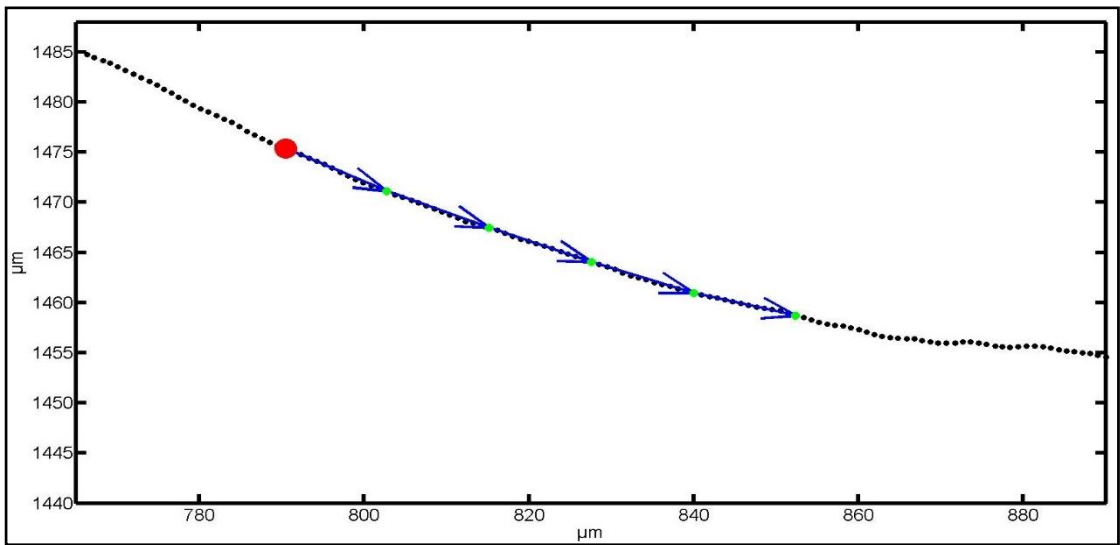


Abbildung 46: Ausschnitt des Rands eines Nematoden. Die schwarzen Punkte sind die Randpunkte des aufbereiteten Rands. Der rote Punkt ist der Randpunkt P_m . Die grünen Punkte sind diejenigen Punkte auf dem Rand des Nematoden, dessen Abstände vom Punkt P_m ein Vielfaches der eingestellten Differenzlänge k sind. Die blauen Vektoren sind die ersten 5 Differenzvektoren des Punkts P_m .

Im nächsten Schritt werden alle Differenzvektoren \vec{v}_{M_i} des Punktes P_M zu einer Vektorkette $V_M = (\vec{v}_{M_1}, \vec{v}_{M_2}, \dots, \vec{v}_{M_J})$ zusammengefasst (siehe Abbildung 47). Die Anzahl an Differenzvektoren und die Differenzlänge k können eingestellt werden, und sind so zu wählen, dass die Länge der resultierenden Vektorkette in etwa dem Umfang des Kopfs entspricht. D. h. die Vektorkette sollte über den kompletten Kopf des Nematoden reichen. Mit einem speziellen Echtzeit-Plot können schnell geeignete Werte für die beiden Größen gefunden werden. (Die Anzahl an Differenzvektoren einer Vektorkette muss allerdings eine gerade Zahl sein.) Da der Abstand der Randpunkte einander angeglichen wurde (Arbeitsschritt 1), ist die Länge der Vektorkette unabhängig vom Startpunkt P_M .

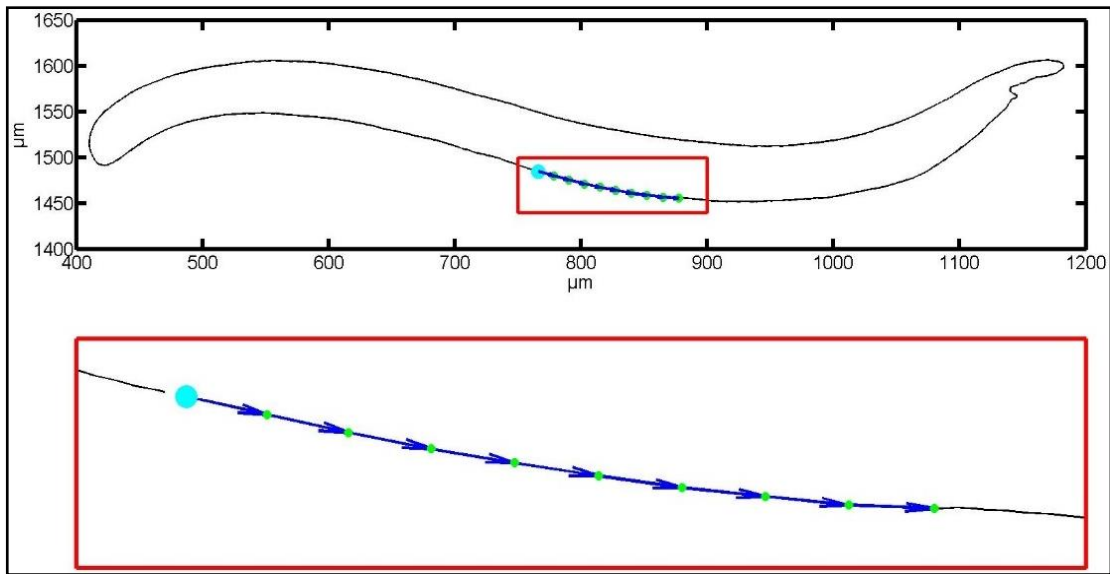


Abbildung 47: Vektorkette V_m des Randpunkts P_m (türkiser Punkt). **(oben)** In der obigen Abbildung kann die Länge der Vektorkette im Vergleich zum gesamten Umfang des Nematoden gesehen werden. Die Vektorkette muss in etwa der Kopfgröße des Nematoden entsprechen. **(unten)** Vergrößerung des rot eingerahmten Bereichs. Der Punkt P_M ist der Startpunkt der Vektorkette. Alle (blau) eingezeichneten Vektoren gehören zur Vektorkette des Punktes P_M . Grün eingezeichnet sind die dazugehörigen Randpunkte mit der eingestellten Differenzlänge k , aus deren Differenz sich die einzelnen (Differenz-)Vektoren der Vektorkette ergeben.

Ist die richtige Länge der Vektorkette eingestellt, werden im nächsten Schritt um den gesamten Rand des Nematoden Vektorketten gelegt (siehe Abbildung 48). Dabei besitzen alle Vektorketten die gleiche Anzahl an Differenzvektoren. Die Startpunkte dieser Vektorketten werden nach dem folgenden Muster bestimmt: Ist der Punkt P_M Startpunkt der ersten Vektorkette V_1 , dann ist der Punkt P_{M+k} Startpunkt der zweiten Vektorkette V_2 und der Punkt P_{M+2k} Startpunkt der dritten Vektorkette V_3 . D. h. jeder Punkt P_j des Rands ist der Startpunkt einer Vektorkette, wenn dessen Abstand vom Startpunkt P_M ein Vielfaches der Differenzlänge k ist, also wenn gilt: $P_j = P_{M+ik}$ mit $i = 1, 2, 3, \dots$. Nach diesem Verfahren wird nun jedem Startpunkt $S_i = P_{M+ik}$ eine Vektorkette V_i zugeordnet. Dadurch wird der gesamte Rand des Objekts mit Vektorketten abgedeckt.

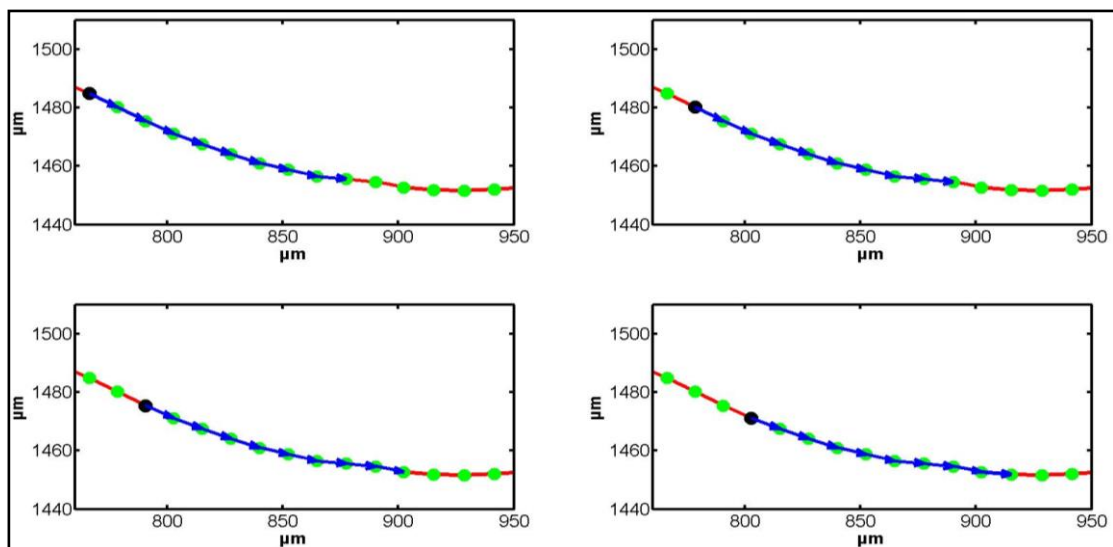


Abbildung 48: Startpunkte (S_i) der Vektorketten (V_i). In den obigen Abbildungen sind vier aufeinanderfolgende Startpunkte (schwarze Punkte) mit dazugehöriger Vektorkette (blauen Vektoren) eingezeichnet. Zwei aufeinanderfolgende Vektorketten besitzen bis auf den ersten und den letzten (Differenz-)Vektor die gleichen Vektoren. In den obigen Abbildungen ist immer ein Ausschnitt des aufbereiteten Rands (rote Linie) eines Nematoden gezeigt. Alle grünen Punkte sind Startpunkte von Vektorketten und besitzen immer den gleichen Abstand voneinander.

Im nächsten Schritt werden die folgenden Skalarprodukte für jede Vektorkette berechnet. Ist V_i eine beliebige Vektorkette auf dem Rand des Nematoden und besitzt sie die Differenzvektoren \vec{v}_n mit $n = 1, 2, 3, \dots, J$, dann ergeben sich die gesuchten Skalarprodukte $\langle V_i \rangle$ mit:

$$\langle V_i \rangle_k = \frac{\vec{v}_k \cdot \vec{v}_{J-k-1}}{|\vec{v}_k| \cdot |\vec{v}_{J-k-1}|} \quad \text{mit} \quad k = 1, 2, 3, \dots, J/2 \quad (13)$$

Somit gilt:

$$\langle V_i \rangle_1 = \frac{\vec{v}_1 \cdot \vec{v}_J}{|\vec{v}_1| \cdot |\vec{v}_J|} \quad , \quad \langle V_i \rangle_2 = \frac{\vec{v}_2 \cdot \vec{v}_{J-1}}{|\vec{v}_2| \cdot |\vec{v}_{J-1}|} \quad , \quad \dots \quad (14)$$

Im letzten Schritt wird noch die Summe dieser Skalarprodukte berechnet und dem Startpunkt S_i der Vektorkette V_i zugeordnet.

$$f(S_i) = \sum_{l=1}^{J/2} \langle V_i \rangle_l \quad (15)$$

Die Funktion f ordnet jedem Startpunkt S_i einer Vektorkette V_i die Summe der Skalarprodukte seiner Differenzvektoren \vec{v}_n zu (siehe Abbildung 49).

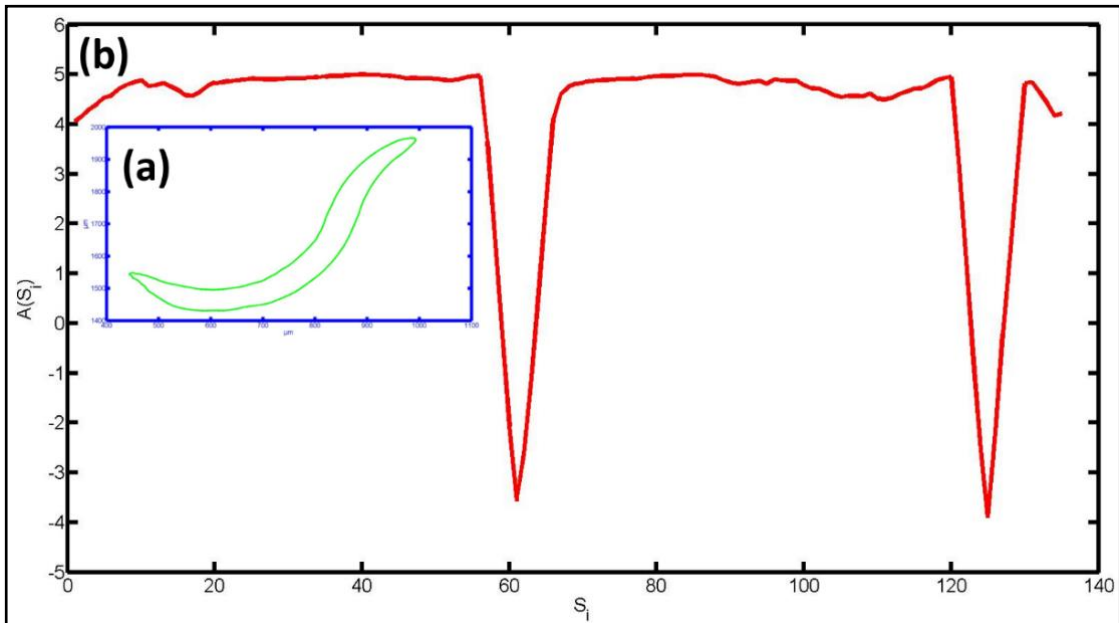


Abbildung 49: (a) Rand eines Nematoden. (b) Funktionsgraf der (Kontroll-)Funktion f des Nematoden. Mit dieser Funktion lassen sich die beiden Enden des Nematoden einfach finden, weil f genau an den Stellen seine Minima besitzt, an denen sich die Enden des Nematoden befinden.

Mit dieser Funktion lässt sich die Position von Kopf und Schwanz der Nematoden einfach bestimmen, da die Funktion an den beiden Enden des Nematoden ihre einzigen Minima hat. Die Funktion wird an diesen Stellen minimal, da an den Enden die Richtungen der beiden Differenzvektoren der Vektorpaare die größten Unterschiede haben. D. h. die einzelnen Skalarprodukte werden minimal und dadurch wird f minimal. Da sich die beiden Minima deutlich von den restlichen Funktionswerten unterscheiden, lassen sie sich einfach finden. Zusätzlich ist es mit der (Kontroll-)Funktion möglich, Rückschlüsse auf die Form des getrackten Objekts zu ma-

chen und es können sogar Aussagen über die Qualität der Aufnahme gemacht werden. Insgesamt ergeben sich 5 verschiedene Kriterien für die Kontrollfunktion, mit denen das getrackte Objekt charakterisiert werden kann.

- **Werte der Minima:**

Ist die Länge der Vektorketten korrekt eingestellt, ergeben sich zwei deutliche Minima an den beiden Enden des Nematoden. Da jedoch die Nematoden bei ihrer Fortbewegung den Kopf und Schwanz auch in z-Richtung bewegen, kann es vorkommen, dass eines der beiden Enden während dem Tracking aus dem Fokus des Objektivs gerät und nicht mehr vollständig von der Kamera erfasst wird. In diesem Fall verliert das entsprechende Ende oft seine Symmetrie. Dadurch besteht die Vektorkette direkt am Mittelpunkt des entsprechenden Nematoden-Endes nicht mehr aus beinahe antiparallelen Vektorpaaren und folglich vergrößert sich der Funktionswert des jeweiligen Minimums. Damit deutet ein zu großer Wert für ein Minimum darauf hin, dass eines der beiden Enden nicht vollständig von der Kamera aufgenommen bzw. nicht sauber vom Hintergrund getrennt wurde.

Kontroll-Einstellung 1: → Maximalwert der Minima

- **Breite der Minima:**

Die Längsseiten der Nematoden laufen an den beiden Enden (Kopf und Schwanz) spitz und symmetrisch zusammen. Dadurch ergeben sich die schmalen Minima der Funktion f . Je spitzer die beiden Seiten an den Enden aufeinander zulaufen, desto geringer ist die Breite des dazugehörigen Minimums. Ein zu breites Minimum deutet deshalb auf ein Problem bei der Aufnahme oder dem Auslesen des entsprechenden Endes hin.

Kontroll-Einstellung 2: → maximale Breite der Minima

- **Vergleich der beiden Minima:**

Die beiden Enden des Nematoden besitzen in etwa die gleiche Form und Größe. Daher sollten auch die Minima einen vergleichbaren Wert aufweisen. Ist die Differenz der beiden Minima sehr groß, wurde höchstwahrscheinlich ein Ende nicht sauber erfasst.

Kontroll-Einstellung 3 → maximale Differenz der Minima

- **Anzahl der Minima:**

Besitzt die Funktion genau zwei Minima und ist sonst nahezu konstant, hat der Rand des getrackten Objekts genau zwei Enden (Kopf und Schwanz) und verläuft ansonsten relativ glatt. Besitzt hingegen die Funktion nicht exakt zwei Minima, muss ein Fehler in der Aufnahme vorliegen. Beispielsweise könnte sich ein Staubkorn mit der passenden Größe im Blickfeld der Kamera befunden haben.

Kontroll-Einstellung 4 → Anzahl der Minima

- **Abstand der Minima:**

Als fünftes Kriterium kann noch der Abstand der beiden Minima voneinander betrachtet werden. Im Idealfall teilen die beiden Minima den geschlossenen Rand des Nematoden in zwei gleich große Hälften. Jede Seite reicht vom Mittelpunkt des Kopfs bis zum Mittelpunkt des Schwanzes. Sind die beiden Seiten etwa gleich lang, befinden sich die gefundenen Enden an der richtigen Position.

Kontroll-Einstellung 5 → maximaler Längenunterschied der beiden Seiten

Alle 5 beschriebenen Kontroll-Einstellungen können für die Auswertung der getrackten Objekte unabhängig voneinander zu- bzw. abgeschaltet werden. Besteht bei der Überprüfung der Messdaten ein getracktes Objekt eine der zugeschalteten Kontrollen nicht, wird das Objekt bei der späteren Analyse der Bewegungsdynamik nicht mit ausgewertet. Die Kontroll-Einstellungen können entweder mit Dreh- und Schieberegler oder mit Eingabefeldern auf der Benutzeroberfläche des Kontroll-Programms eingegeben werden. Mit den zur Verfügung stehenden Echtzeit-Plots können gute Kontroll-Einstellungen schnell und einfach gefunden werden.

Berechnung der Mittellinie:

Besteht ein getracktes Objekt alle eingebauten Kontrollen, so kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Objekt um einen (sauber getrackten) Nematoden handelt. Im letzten Arbeitsschritt wird noch die Mittellinie der Nematoden berechnet (siehe Abbildung 50). Hierfür wird zunächst der Rand des Nematoden in zwei Hälften S_1 und S_2 geteilt. Jede Hälfte reicht vom Mittelpunkt des Kopfs bis zum Mittelpunkt des Schwanzes. Anschließend wird zu jedem Punkt P_k^1 auf der Seite S_1 derjenige Punkt P_j^2 auf der Seite S_2 gesucht, der den kleinsten Abstand zu P_k^1 hat. Der dazugehörige Punkt M_k auf der Mittellinie des Nematoden ergibt sich aus dem Mittelwert der beiden Punkte:

$$M_k = 0,5 \cdot (P_k^1 + P_j^2) \quad (16)$$

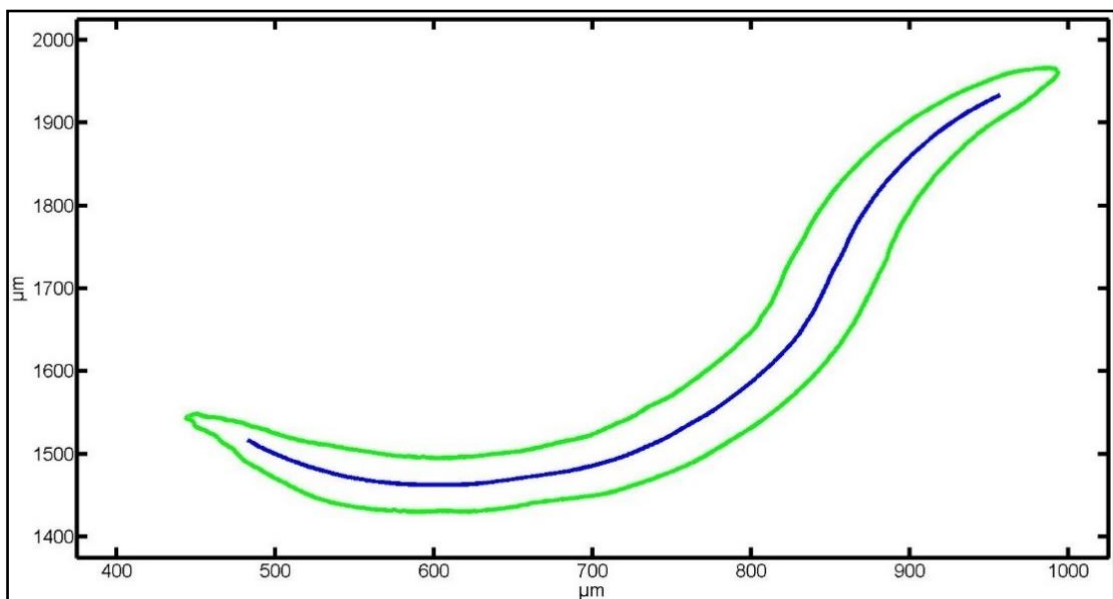


Abbildung 50: Besteht ein Nematode alle Kontrollen, so wird im letzten Arbeitsschritt der Qualitätskontrolle die Mittellinie des Nematoden berechnet. Der Beginn und das Ende der Mittellinie können dabei eingestellt werden.

Sind alle Punkte der Mittellinie berechnet, wird die Mittellinie geglättet und der Abstand der einzelnen Punkte voneinander wird auf den eingestellten Wert gebracht. Zum Schluss kann noch der Beginn und das Ende der Mittellinie bestimmt werden. D. h. die Mittellinie beginnt nicht mehr an der vordersten Spitze des Kopfs, sondern beginnt etwas später. Auch endet die Mittellinie nicht mehr am letzten Punkt der Schwanzspitze, sondern endet etwas früher. Da der Nematode an seinen beiden Enden häufig eine (im Vergleich zum restlichen Körper) unterschiedliche Krümmung hat, können mit diesem Schritt die beiden Enden aus der Mittellinie herausgenommen werden.

automatische Auswertung

Sind alle Kontroll-Einstellungen gemacht, kann mit dem *Button 'Auswertung starten'* die automatische Kontrolle aller aufgenommenen Objekte gestartet werden. Das Programm lädt sich nacheinander alle im angegebenen Ordner vorhandenen Messungen in den Arbeitsspeicher und überprüft jedes getrackte Objekt. Das Ergebnis dieser Einzelbild-Kontrolle wird in den gleichen Ordner gespeichert, aus dem die Messdaten zuvor geladen wurden. Dadurch werden Verwechslungen der einzelnen Messungen vermieden. Von jedem Objekt, das die Einzelbild-Kontrolle besteht, werden

- die Randpunkte,
- die Mittellinie,
- der Zeitpunkt der Aufnahme,
- die fortlaufende Bildnummer
- und die verwendeten Kontroll-Einstellungen

gespeichert.

Segmentierung (zweiter Aufbereitungsschritt)

Im zweiten Aufbereitungsschritt (Segmentierung) werden die einzelnen Aufnahmen zu Tracking-Sequenzen zusammengefasst. Jede Tracking-Sequenz besteht aus mehreren Aufnahmen des gleichen Nematoden und die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen sollte (nahezu) konstant sein. Für diesen Aufbereitungsschritt wurde (wieder) mit einer Kombination aus LabVIEW und Matlab (Software-Konzept) ein eigenes Programm mit Benutzeroberfläche erstellt (siehe Abbildung 51).

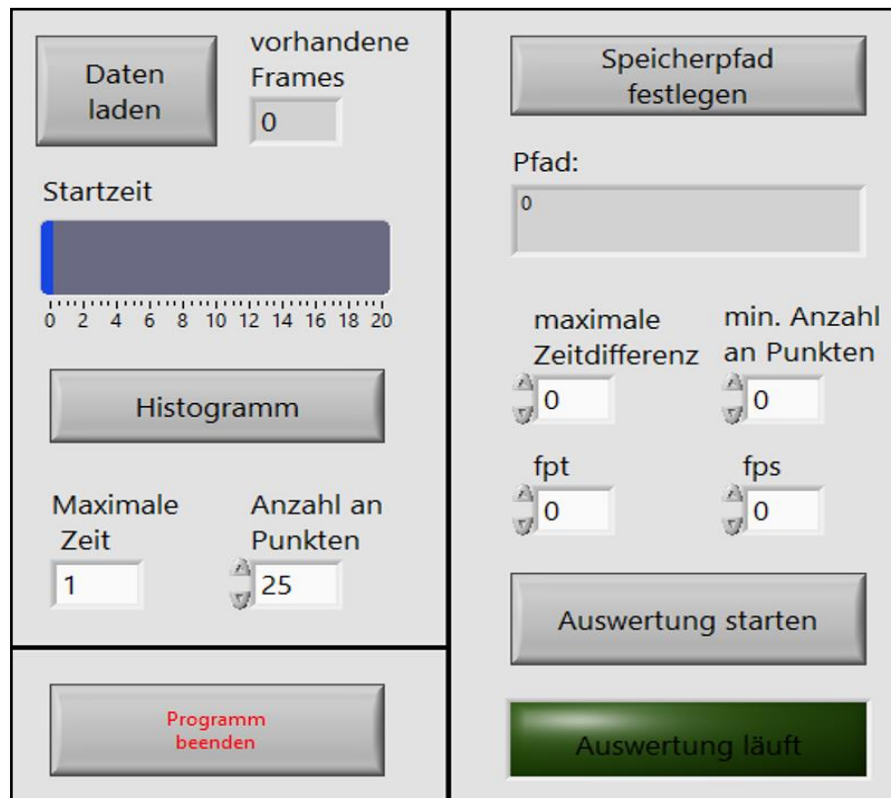


Abbildung 51: Benutzeroberfläche des Programms für die Segmentierung der getrackten Nematoden. Das (selbst) entwickelte Programm kann die einzelnen Aufnahmen der Nematoden zu Tracking-Sequenzen zusammenfassen. (Blockschaltbild im Anhang)

Wegen des festen Messbereichs der ersten beiden Aufnahme-Verfahren laufen während einer Messung die Nematoden immer wieder in und aus dem Blickfeld der Kamera. Dadurch besteht jede Messung aus vielen einzelnen Tracking-Sequenzen. Auch beim dritten Aufnahme-Verfahren können sich mehrere Tracking-Sequenzen pro Messung ergeben, da es passieren kann, dass der gesuchte Nematode in einer Aufnahme nicht gefunden wird. Ein Grund hierfür könnte beispielsweise sein, dass der Nematode den Rand des Bildausschnitts berührt und damit aus dem (Schwellwert-)Bild gelöscht wird.

Funktionsweise des Programms

Der Aufbau und die Funktionsweise des (selbst) entwickelten Programms entsprechen dem bereits bekannten Muster. Bevor die automatische Segmentierung aller Tracking-Daten gestartet werden kann, müssen zunächst einige (Kontroll-) Einstellungen gemacht werden. Diese werden über eine GUI eingegeben und können exemplarisch an ausgewählten Messungen getestet werden.

maximale Zeitdifferenz:

Im ersten Schritt muss die maximal erlaubte Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen einer Tracking-Sequenz festgelegt werden. Ist die verstrichene Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen des gleichen Nematoden kleiner oder gleich der hier eingestellten Zeit, gehören die beiden Aufnahmen zur gleichen Tracking-Sequenz. Ist hingegen die Zeitdifferenz zwischen den beiden Aufnahmen größer, wird die Messung an dieser Stelle in zwei getrennte Tracking-Sequenzen aufgeteilt. Das entwickelte Programm kann jede Messung in beliebig viele Sequenzen zerlegen. Der optimale Wert für die maximal erlaubte Zeitdifferenz ist abhängig von dem verwendeten Aufnahme-Verfahren der Messung.

Die maximal erlaubte Zeitdifferenz einer Tracking-Sequenz ist so zu bestimmen, dass:

- sie größer ist als die maximale Zeitspanne zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen der Kamera.
- sie kleiner ist als die doppelte minimale Zeitspanne zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen der Kamera, d. h. eine Tracking-Sequenz darf keine Lücken¹⁶ besitzen.

Schwankungen der Aufnahme-Geschwindigkeit:

Nicht bei allen Aufnahme-Verfahren ist die Anzahl der aufgenommenen Bilder pro Sekunde konstant, sondern die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen einer Tracking-Sequenz schwankt ein wenig. Die Größenordnung dieser Schwankung hängt von dem Aufnahme-Verfahren ab:

i) Aufnahme-Verfahren I

Bei diesem Verfahren wird jedes aufgenommene Bild erst am PC bearbeitet, bevor die Kamera eine neue Aufnahme machen kann. Die Dauer der Bildbearbeitung am PC ist jedoch abhängig von der Anzahl, Größe und Position der Nematoden im Bild.

ii) Aufnahme-Verfahren II

Die Zeitdifferenz zwischen zwei Aufnahmen einer Sequenz ist bei diesem Verfahren immer $1/fps$, wobei fps die eingestellte Geschwindigkeit der Kamera ist. Da zuerst alle Aufnahmen einer Sequenz gemacht werden und die Auswertung der Bilder erst danach erfolgt, ist die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen immer gleich.

iii) Aufnahme-Verfahren III

Bei dem dritten Verfahren ergibt sich die Schwankung der Aufnahme-Geschwindigkeit durch die unterschiedliche Größe der auszuwertenden Bilder. Da bei diesem Verfahren ebenfalls das aufgenommene Bild erst am PC ausgewertet werden muss, bevor die Kamera eine neue Aufnahme machen kann (vgl. Verfahren I), hängt die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen von der Bearbeitungsdauer der Bilder ab.

¹⁶ Die Differenz der fortlaufenden Bildnummern zwischen zwei Aufnahmen muss immer 1 sein.

Diese (kleinen) Schwankungen der Aufnahme-Geschwindigkeiten müssen bei der Wahl für die maximal erlaubte Zeitdifferenz mit berücksichtigt werden.

Histogramm der Zeitdifferenzen:

Um einen guten Wert für die maximal erlaubte Zeitdifferenz zu finden, kann mit dem Button 'Histogramm' eine Verteilungsfunktion der Zeitdifferenzen zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen des gleichen Nematoden erstellt werden (siehe Abbildung 52). Aus dieser Verteilungsfunktion lässt sich ein guter Wert für die maximal erlaubte Zeitdifferenz einfach ablesen.

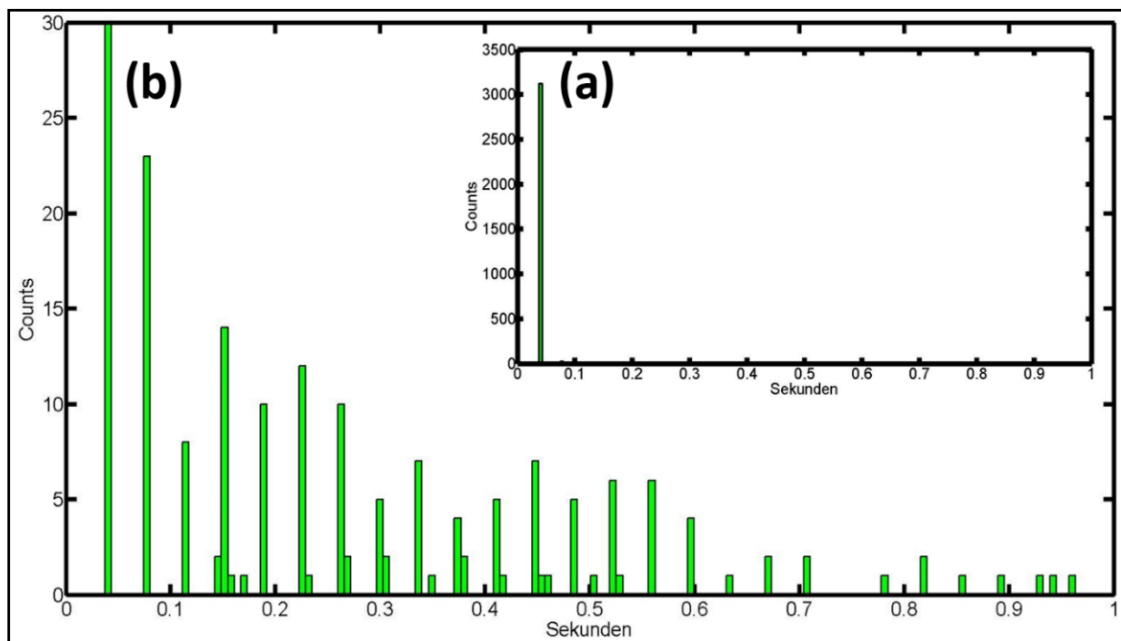


Abbildung 52: (a) Histogramm der Zeitdifferenzen zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen des gleichen Nematoden. Die Messung wurde mit dem Aufnahme-Verfahren II gemacht. (b) Vergrößerung des unteren Bereichs der Verteilungsfunktion. Die Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen des Nematoden kann immer nur ein ganzzahliges Vielfaches der Tracking-Geschwindigkeit des Aufnahme-Verfahrens sein.

Effektive Startzeit:

Im nächsten Schritt kann eine effektive Startzeit der Messungen festgelegt werden. Alle Aufnahmen, die vor Ablauf der eingestellten Startzeit gemacht wurden, werden beim Zusammenbau der Tracking-Sequenzen nicht verwendet. Da die Agarose-Lösungen (Umgebungen) bei 40 °C im Schüttler gelagert wurden und die Messungen sofort nach der Präparation des Probenhalters begannen, wird diese (nachträgliche) Verzögerung benötigt, um die Agarose-Lösungen auf die Messtemperatur von 21 °C abkühlen zu lassen. Auch gibt sie dem Nematoden im Probenhalter genug Zeit, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Das Prinzip einer „effektiven Startzeit“ ermöglicht es praktisch, die Startzeit einer Messung noch im Nachhinein festzulegen.

Mindestlänge der Tracking-Sequenzen:

Als letzte (Kontroll-) Einstellung kann noch die Mindestanzahl an Aufnahmen pro Tracking-Sequenz ausgewählt werden. Es werden nur diejenigen Tracking-Sequenzen einer Messung gespeichert, die die erforderliche Mindestanzahl an Aufnahmen besitzen. Dadurch haben bei der

späteren Auswertung alle Sequenzen die benötigte Mindestlänge, um die Bewegung der Nematoden analysieren zu können.

Auswertung starten:

Sind alle Kontroll-Einstellungen gefunden, muss dem Programm nur noch der Speicherpfad und die zur Messung verwendeten Kamera-Einstellungen (*fpt*, *fps*) mitgeteilt werden. Danach kann mit dem Button '*Auswertung starten*' die automatische Segmentierung aller vorhandenen Messungen gestartet werden, d. h. es werden alle Tracking-Sequenzen (der Messungen) ermittelt, zusammengefasst und anschließend gespeichert. Wurden bei den Messungen mehrere Nematoden in den Probenhalter gesetzt (Multi-Wurmtracking), müssen vor der Segmentierung die einzelnen Nematoden in jeder Aufnahme separiert werden. Dies ist nötig, da jede Tracking-Sequenz immer nur aus Aufnahmen des gleichen Nematoden bestehen darf. Die Identifizierung der unterschiedlichen Nematoden erfolgt anhand ihrer Größe (über eine Minimierung der Fehlerquadrate). Hierfür wurde ein eigenes Matlab-Skript (selbst) geschrieben, das in diesem Fall vor der Segmentierung auf die Tracking-Daten angewandt werden muss.

Bestimmung der absoluten Nematoden-Position

(nur für die Messungen des Aufnahme-Verfahrens III)

In diesem Zwischenschritt werden die (absoluten) Positionen der getrackten Nematoden bestimmt. Hierfür wurde ein spezielles Verfahren (selbst) entwickelt und dazu ein Programm mit Benutzeroberfläche geschrieben (siehe Abbildung 53).

Abbildung 53: Benutzeroberfläche des Programms zur Bestimmung der absoluten Nematoden-Position. Bei den Messungen des dritten Aufnahme-Verfahrens muss vor der Bewegungsanalyse noch die absolute Position der Nematoden berechnet werden. Diese ergibt sich aus der Position des Mittelpunkts des Nematoden und der Fahrweite der xy-Stage zum Zeitpunkt der Aufnahme. Für diesen Schritt wurde eigens mit einer Kombination aus LabVIEW und Matlab (Software-Konzept) ein Programm erstellt. (Blockschaltbild befindet sich im Anhang)

Die absolute Position eines Nematoden in einer Aufnahme ergibt sich aus den Koordinaten seines Mittelpunkts im (Schwellwert-)Bild und der Fahrweite der Stage zum Zeitpunkt der Aufnahme (siehe Abbildung 54 a und b). Der Mittelpunkt des Nematoden ist immer derjenige Punkt auf seiner Mittellinie, der diese in zwei gleich lange Hälften teilt.

Das Verknüpfen der beiden Positionen (Fahrweite und Mittelpunkt) erfolgt getrennt zwischen x- und y-Richtung. Erst am Ende dieses Zwischenschritts werden die beiden Koordinaten (x und y) der absoluten Nematoden-Positionen zusammengefügt. Da die ausgeführten Arbeitsschritte für beide Richtungen identisch sind, wird in der Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte die Richtung 'q' stellvertretend für x- oder y-Richtung benutzt.

Funktionsweise des Programms:

Das hierfür entwickelte Programm funktioniert nach dem folgenden Prinzip:

- i) Eine beliebige Tracking-Sequenz wird in den Arbeitsspeicher geladen.
- ii) Die zur Aufbereitung benötigten Einstellungen können exemplarisch an der geladenen Tracking-Sequenz gesucht und getestet werden.
- iii) Alle vorhandenen Tracking-Sequenzen werden mit den ausgewählten Einstellungen automatisch aufbereitet.

Minimale Strecke:

Im ersten Schritt sucht das Programm alle Aufnahmen der Tracking-Sequenz, in denen die Stage um mehr als die '*minimale Strecke*' in eine Richtung gefahren ist (siehe Abbildung 54 c). Die gefahrene Strecke der Stage in einer Aufnahme ergibt sich aus der Differenz der Fahrweite der Stage in dieser und der vorhergehenden Aufnahme, d. h. ist X_N die Fahrweite der Stage (in Richtung q) in der N -ten Aufnahme der Tracking-Sequenz, dann ist gefahrene Strecke d_N gegeben mit: $d_N = X_N - X_{N-1}$.

- a) keine Fahrt der Stage war größer als die '*minimale Strecke*'

Findet das Programm in einer Tracking-Sequenz keine Aufnahmen, in denen sich die Stage um mehr als die '*minimale Strecke*' in eine Richtung bewegt hat, ergeben sich die absoluten Positionen des Nematoden in dieser Sequenz durch Addition der Koordinaten des Nematoden-Mittelpunkts im Bild mit der Fahrweite der Stage zum Zeitpunkt der Aufnahme.

- b) es sind Fahrten der Stage vorhanden, die größer als die '*minimale Strecke*' sind

Findet hingegen das Programm in einer Tracking-Sequenz eine Aufnahme, in der sich die Stage um mehr als die '*minimale Strecke*' in Richtung q bewegt hat, wird die q-Koordinate der absoluten Nematoden-Position in der entsprechenden Aufnahme (zunächst) nicht berechnet. Dies betrifft ausschließlich die Koordinate in q-Richtung, die andere Koordinate der absoluten Nematoden-Position wird berechnet.

Der Wert (in mm) für die '*minimale Strecke*' kann eingestellt werden und ist die einzige (Kontroll-)Einstellung, die bei diesem Zwischenschritt gemacht werden muss.

Maximal erlaubte Fahrdauer:

Fährt die Stage in mehr als drei aufeinanderfolgenden Aufnahmen um jeweils mehr als die '*minimale Strecke*' in Richtung q, werden die entsprechenden Aufnahmen gelöscht und die Tracking-Sequenz wird an dieser Stelle in zwei kürzere Sequenzen aufgeteilt. Diese '*maximal erlaubte Fahrdauer*' wird benötigt, da die Stage und die Kamera nicht miteinander synchronisiert sind. D. h. für die Aufnahme eines Bilds hält die Stage nicht an. Bewegt sich jedoch die Stage während der Aufnahme, lässt sich die exakte Fahrweite der Stage zum Zeitpunkt der Aufnahme nicht ermitteln.

Fährt daher die Stage

- über eine längere Zeit (min. 3 Aufnahmen)
- mit hoher Geschwindigkeit (mehr als die '*minimale Strecke*' pro Aufnahme)
- ohne zwischenzeitliche Pause,

kann die absolute Nematoden-Position nicht mehr hinreichend genau bestimmt werden. In diesem Sinn bedeutet „Pause der Stage“, dass die Fahrweite der Stage in q-Richtung zwischen zwei Aufnahmen kleiner als die '*minimale Strecke*' ist. Das Problem der zu schnellen und zu langen Fahrten der xy-Stage lässt sich jedoch durch eine gute Wahl der Tracking-Einstellungen bei den Messungen (weitestgehend) vermeiden.

Ergänzen der fehlenden Koordinaten:

Als Nächstes werden die (im ersten Arbeitsschritt) nicht berechneten Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen bestimmt. Dies betrifft alle Aufnahmen, in denen die Stage weiter als die '*minimale Strecke*' in q-Richtung gefahren ist. Die noch fehlende q-Koordinate ergibt sich aus dem Mittelwert der bereits berechneten q-Koordinaten in den zuvor und danach kommenden Aufnahmen (siehe Abbildung 54 d). Da bereits alle Tracking-Sequenzen mit zu langen Fahrten der Stage aufgespaltet wurden, darf sich in allen vorhandenen Sequenzen die Stage in maximal 3 aufeinanderfolgenden Aufnahmen (ohne zwischenzeitliche Pause) um eine größere Distanz als die '*minimale Strecke*' bewegt haben. Daraus ergeben sich folgende Möglichkeiten:

- a) Die Stage fährt in der Aufnahme 2 um mehr als die '*minimale Strecke*' in q-Richtung:
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 2 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 1 und 3.
- b) Die Stage fährt in den Aufnahmen 3 und 4 um jeweils mehr als die '*minimale Strecke*' in q-Richtung:
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 3 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 1,2 und 5.
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 4 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 2,5 und 6.
- c) Die Stage fährt in den Aufnahmen 3, 4 und 5 um jeweils mehr als die '*minimale Strecke*' in q-Richtung:
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 3 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 1,2 und 6.
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 5 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 2,6 und 7.
 - Die q-Koordinate der Nematoden-Position 4 ergibt sich aus dem Mittelwert der q-Koordinaten der Nematoden-Positionen 3 und 5.

Bei diesem Verfahren wird immer nur die q-Koordinate der absoluten Nematoden-Position ersetzt, die andere Koordinate bleibt dabei unverändert. Da für die ergänzte Koordinate der Mittelwert aus mehreren nebenan liegenden Nematoden-Positionen verwendet wird, passt

sich die eingefügte Nematoden-Position seinen Nachbarn gut an. Im letzten Schritt werden noch die x- und y-Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen zusammengeführt. Mit dem hier beschriebenen (und selbst entwickelten) Verfahren lässt sich die Bewegung der Nematoden über lange Strecken aufnehmen, da die Stage gefahren werden kann, ohne dass dabei die Tracking-Sequenz beendet werden muss.

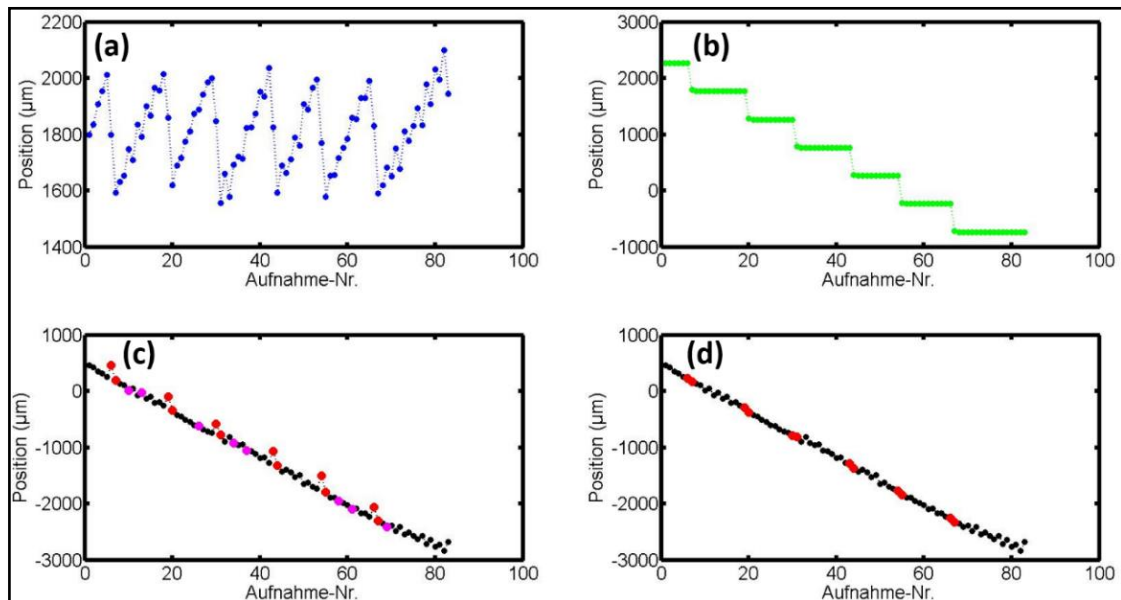


Abbildung 54: Die komponentenweise Verknüpfung der Mittelpunkte und Fahrweiten zur Bestimmung der absoluten Nematoden-Position. **(a)** q-Koordinaten der Mittelpunkte und **(b)** Fahrweiten der Stage in q-Richtung einer Tracking-Sequenz. **(c)** Addition der q-Koordinate des Mittelpunkts und der Fahrweite der Stage in q-Richtung in jeder Aufnahme der Tracking-Sequenz. Die Punkte in Schwarz sind die q-Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen in den Aufnahmen, in denen sich die Stage nicht bewegt hat. Die Punkte in Violett sind die q-Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen in den Aufnahmen, in denen sich die Stage in q-Richtung um weniger als die '*minimale Strecke*' bewegt hat. Die Punkte in Rot sind die q-Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen in den Aufnahmen, in denen sich die Stage um mehr als die '*minimale Strecke*' in q-Richtung bewegt hat, d. h. diese werden ausgetauscht. **(d)** Die q-Koordinaten der absoluten Nematoden-Positionen einer Tracking-Sequenz. In Rot sind die ausgetauschten q-Koordinaten der Nematoden-Positionen eingezeichnet. Die ausgetauschten Koordinaten ergeben sich aus den Mittelwerten der zuvor und danach kommenden absoluten Nematoden-Positionen.

Ist die (Kontroll-) Einstellung '*minimale Strecke*' bestimmt, muss dem Programm nur noch der Speicherort mitgeteilt werden, bevor mit dem Button '*Auswertung starten*' die automatische Berechnung der absoluten Nematoden-Positionen aller vorhandenen Tracking-Sequenzen (des Aufnahme-Verfahren III) beginnen kann. Nach der Auswertung werden am ausgewählten Speicherort alle geladenen Tracking-Daten plus den neu berechneten absoluten Nematoden-Positionen gespeichert.

4.3 Analyse der Daten und ermittelte Größen

Nach der Aufbereitung und Segmentierung der Tracking-Daten erfolgt eine Bewegungsanalyse. Dabei wird geprüft, ob sich die Nematoden in den einzelnen Tracking-Sequenzen überhaupt fortbewegt haben. Auch für diesen Kontrollschritt wurde mit einer Kombination aus Matlab und LabVIEW (Software-Konzept) ein spezielles Programm mit Benutzeroberfläche (selbst) erstellt (siehe Abbildung 55).

Abbildung 55: Benutzeroberfläche des Programms zur Analyse der Fortbewegung. Bei der Bewegungsanalyse wird die Anomalie der Bewegung von jeder einzelnen Tracking-Sequenz überprüft. Damit lässt sich feststellen, ob sich der Nematode in der vorliegenden Tracking-Sequenz überhaupt bewegt hat. Für die Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* werden nur Tracking-Sequenzen benötigt, in denen sich der Nematode fortbewegt hat. (Blockschaltbild befindet sich im Anhang.)

Für die Bewegungsanalyse wird in jeder Tracking-Sequenz die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) der Nematoden-Bewegung berechnet und daraus der Anomalie-Parameter be-

stimmt. Ist die Anomalie der Bewegung innerhalb eines festgelegten Bereichs, hat die überprüfte Tracking-Sequenz die Bewegungsanalyse bestanden. Diese Analyse wird durchgeführt, da die Nematoden hin und wieder ihre Bewegung für eine unbestimmte Zeit vollständig einstellen. Für die quantitative Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* sind jedoch nur Tracking-Sequenzen zu gebrauchen, in denen sich die Nematoden auch fortbewegt haben.

Funktionsweise des Programms:

Das (eigenständig) entwickelte Programm funktioniert wieder nach dem bekannten Prinzip, wonach die benötigten Einstellungen an einer ausgewählten Tracking-Sequenz gesucht und getestet werden können, bevor mit den gefundenen Einstellungen alle Tracking-Sequenzen automatisch überprüft werden.

Mittlere quadratische Verschiebung:

Im ersten Arbeitsschritt wird in der ausgewählten Tracking-Sequenz die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) der Nematoden-Bewegung berechnet. Ist die Bahnkurve der Mittelpunkte des Nematoden gegeben mit: $\{\vec{x}(t_1), \vec{x}(t_2), \dots, \vec{x}(t_N)\}$, dann ist das MSD dieser Sequenz:

$$MSD(k \cdot \Delta t) = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^{N-k} |\vec{x}(t_i) - \vec{x}(t_{i+k})|^2 \quad (17)$$

, mit $k = 1, 2, 3, \dots, N-1$. Der Zeitschritt Δt entspricht der mittleren Dauer zwischen zwei Aufnahmen der Kamera. D. h. die Zeitauflösung der MSD's ist abhängig von dem verwendeten Aufnahme-Verfahren der Tracking-Sequenz. Für die anschließende Berechnung des Anomalie-Parameters wird von jedem Zeitschritt ($t_k = k \cdot \Delta t$) der Mittelwert der einzelnen quadratischen Verschiebungen [$MSD_k = MSD(k \cdot \Delta t)$] verwendet (siehe Abbildung 56).

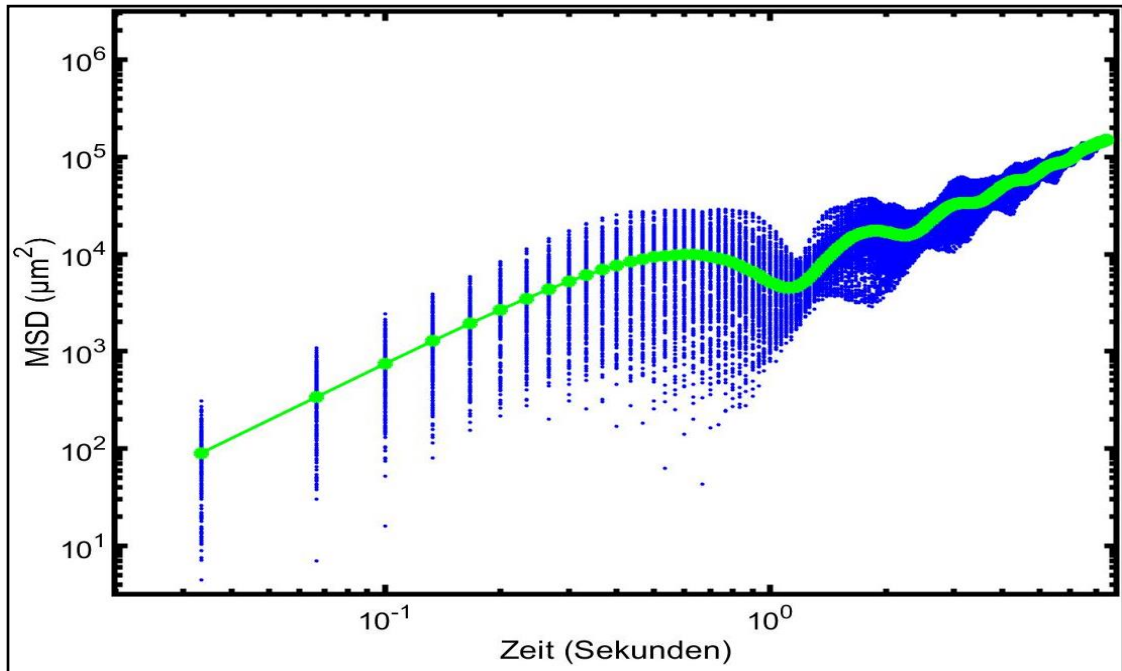


Abbildung 56: Mittlere quadratische Verschiebung einer Tracking-Sequenz. Die blauen Punkte entsprechen den berechneten quadratischen Verschiebungen für die einzelnen Zeitschritte ($k \cdot \Delta t$). Die grünen Punkte ergeben sich dann aus dem (arithmetischen) Mittelwert aller berechneten quadratischen Verschiebungen zu einem bestimmten Zeitschritt. Die Tracking-Sequenz wurde mit dem Aufnahme-Verfahren II in einer Lösung mit 0,5% Agarose-Anteil aufgenommen, d. h. der zeitliche Abstand zwischen zwei Aufnahmen beträgt 1/30 Sekunde. Die Dauer der gesamten Tracking-Sequenz beträgt ca. 7,5 Sekunden.

Abstand der Fitpunkte:

Da die Ausgleichsgerade für das MSD in einem Koordinatensystem mit logarithmischer Skalierung der Achsen gesucht wird, wird der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Fitpunkten nicht konstant gelassen, sondern wächst exponentiell von Fitpunkt zu Fitpunkt. Für die idealen Zeitkoordinaten der Fitpunkte gilt:

$$t_n = 10^{T_0 + n \cdot \Delta T} \quad \text{mit} \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (18)$$

T_0 ist die Startzeit des Fits und mit der Größe ΔT kann der zeitliche Abstand der einzelnen Fitpunkte voneinander eingestellt werden. Dadurch hat jede Zeitdekade des MSD's die gleiche Anzahl an Fitpunkten bzw. der zeitliche Abstand der Fitpunkte bleibt in einem logarithmischen Koordinatensystem immer der Gleiche (siehe Abbildung 58).

Lineare Interpolation:

Da für alle Zeitpunkte t_i , für die sich das MSD der Nematoden-Bewegung berechnen lässt, gilt:

$$t_i = i \cdot \Delta t \quad \text{mit} \quad i = 1, 2, 3, \dots$$

und Δt als der mittleren Dauer zwischen zwei Aufnahmen der Kamera, sind die Werte des MSD's zu den idealen Zeitpunkten t_n (ideale Zeitkoordinaten der Fitpunkte):

$$t_n = 10^{T_0 + n \cdot \Delta T} \quad \text{mit} \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{siehe Formel 18})$$

höchstwahrscheinlich nicht bekannt. Daher werden diejenigen Punkte $(t_i, \text{MSD}(t_i))$ als Fitpunkte verwendet, dessen Zeitpunkte t_i am nächsten an den idealen Zeitpunkten t_n liegen. Um dabei eine möglichst geringe Abweichung von den Idealpunkten $(t_n, \text{MSD}(t_n))$ zu erhalten, werden mittels linearer Interpolation zwischen jeweils zwei Punkten des berechneten MSD's weitere Zwischenpunkte eingefügt (siehe Abbildung 57).

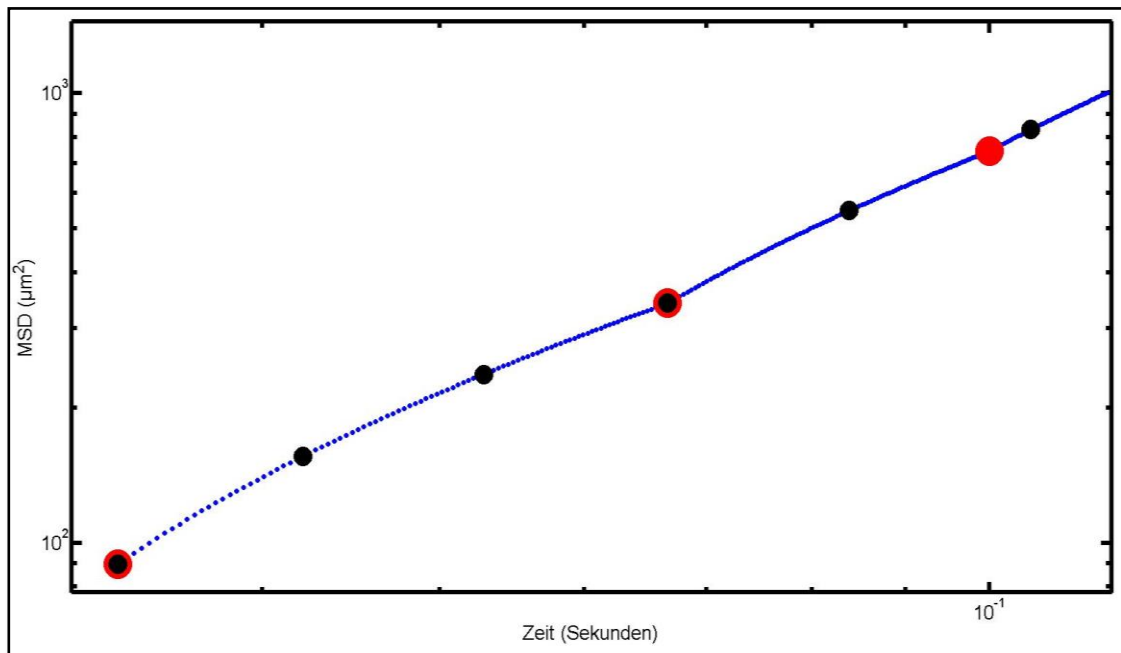


Abbildung 57: Vergrößerung des vorderen Bereichs des MSD's einer Tracking-Sequenz. Damit der zeitliche Abstand der Fitpunkte (schwarze Punkte) im loglog-Plot immer (nahezu) konstant bleibt, werden zwischen den berechneten Punkten des MSD's (rote Punkte) mittels linearer Interpolation zusätzliche Punkte (blaue Punkte) eingefügt.

Da die Ausgleichsgerade des MSD's in einem Koordinatensystem mit logarithmischer Achsenskalierung zu bestimmen ist, werden für die analytische Berechnung der Ausgleichsgeraden die Punkte $(\log t_i, \log MSD(t_i))$ verwendet.

Fitparameter:

Für den linearen Fit an das MSD müssen die folgenden Fitparameter festgelegt werden:

- a) Startzeit
Als mögliche Fitpunkte kommen nur diejenigen Punkte des MSD's infrage, deren Zeitkoordinate (t_k) größer als die eingestellte Startzeit ist.
- b) Mindestdauer
Es werden nur Tracking-Sequenzen gefittet, die eine längere Gesamtdauer als die eingestellte Mindestdauer besitzen.
- c) Endzeit
Für den linearen Fit werden nur diejenigen Fitpunkte verwendet, deren Zeitkoordinate (t_k) kleiner als die ausgewählte Endzeit ist.

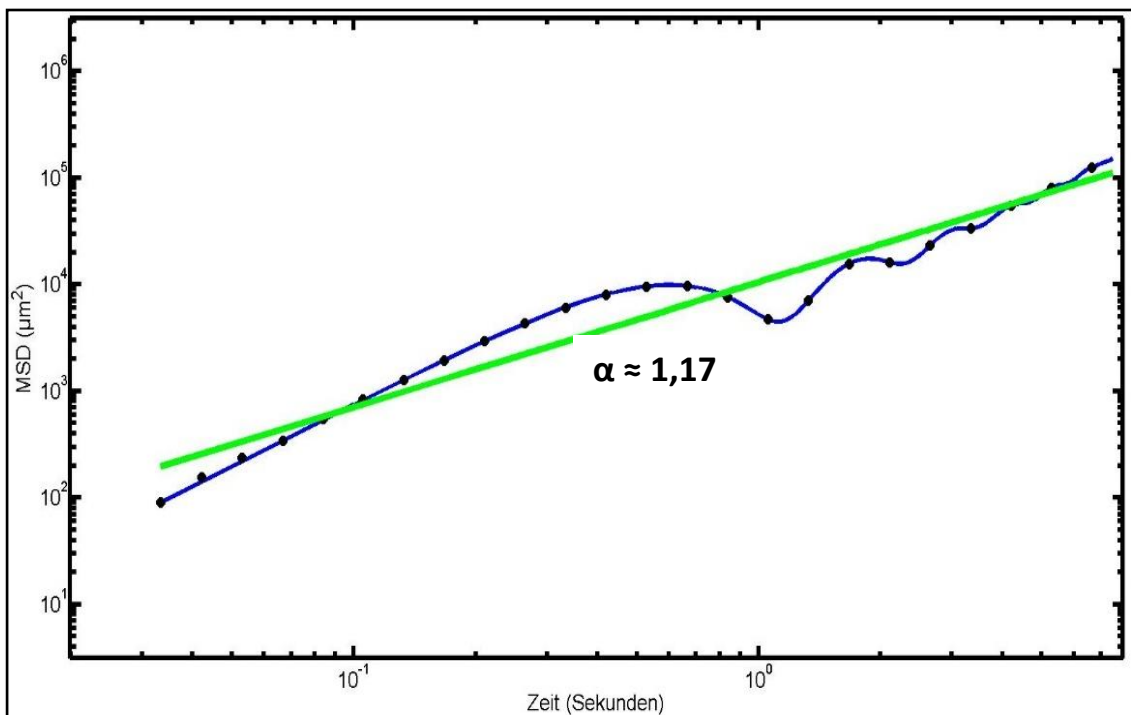


Abbildung 58: linearer Fit an das MSD einer Tracking-Sequenz. Um den Anomalie-Parameter der Tracking-Sequenz zu bestimmen, wird die mittlere quadratische Verschiebung der Sequenz (blau) mit einer Ausgleichsgeraden (grün) angenähert. Die Fitpunkte (schwarz) besitzen im loglog-Plot den gleichen zeitlichen Abstand. Für die obige Tracking-Sequenz ergab sich damit ein Anomalie-Parameter von 1,17.

Anomalie der Bewegung:

Mit dem Ansatz $MSD \sim t^\alpha$ ergibt sich der Anomalie-Parameter α einer Tracking-Sequenz aus der Steigung der Ausgleichsgeraden. Dieser (Anomalie-) Parameter dient als Auswahlkriterium für die einzelnen Tracking-Sequenzen. Besitzt die überprüfte Tracking-Sequenz eine Anomalie zwischen einem zuvor festgelegten Minimal- und Maximalwert, hat sie die Bewegungsanalyse überstanden.

automatische Auswertung:

Sind alle (Analyse-) Einstellungen gefunden, kann mit dem Button '*Auswertung starten*' die automatische Bewegungsanalyse aller Tracking-Sequenzen beginnen. Alle Tracking-Sequenzen, die diese letzte Kontrolle überstanden haben, werden für die im Anschluss folgende quantitative Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* verwendet.

ermittelte Größen

Die ermittelten physikalischen Messgrößen für die Analyse der Bewegungsdynamik lassen sich in zwei Gruppen aufteilen:

- physikalische Größen, für deren Berechnung ausschließlich die Bahnkurven der Mittelpunkte benötigt werden (beschreiben die Bahnkurven der Nematoden).
- physikalische Größen, die die gesamte Körperform der Nematoden während der Bewegung beschreiben bzw. bei deren Berechnung die Körperform in irgendeiner Art und Weise benötigt wird (beschreiben die Körperform der Nematoden).

a) Physikalische Größen zur Beschreibung der Bahnkurven

Verschiebung der Mittelpunkte:

Die Verschiebung ist die Positionsänderung des Mittelpunkts zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen der Kamera (siehe Abbildung 59). Ist die Bahnkurve einer Tracking-Sequenz gegeben mit $X = \{\vec{x}(t_1), \vec{x}(t_2), \dots, \vec{x}(t_N)\}$, ergeben sich die einzelnen Verschiebungen V_i mit:

$$V_i = |\vec{x}(t_{i+1}) - \vec{x}(t_i)| \quad \text{mit} \quad i = 1, 2, 3, \dots, N - 1 \quad (19)$$

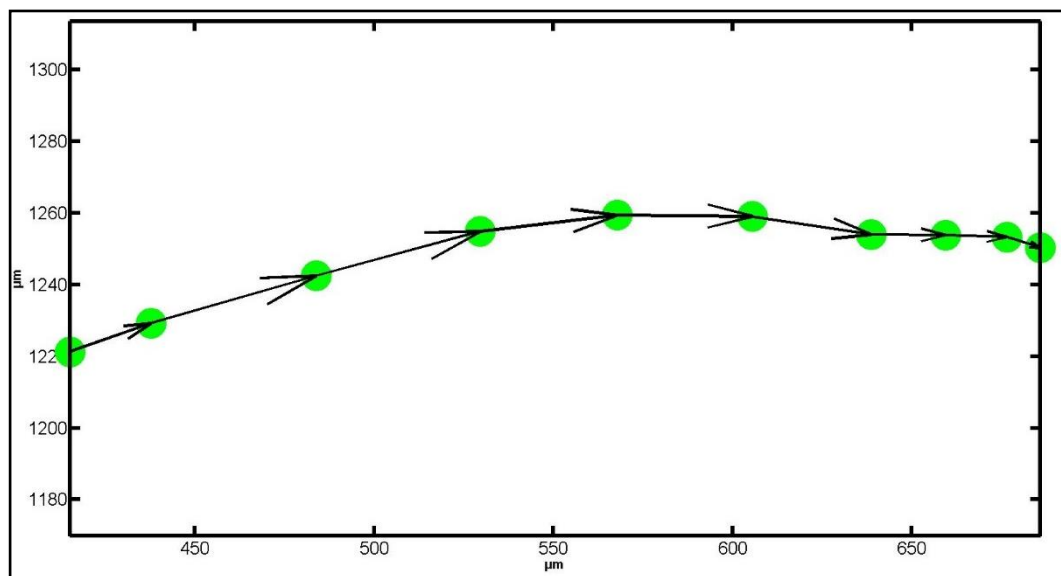


Abbildung 59: In der obigen Abbildung ist ein Ausschnitt einer Bahnkurve eines Nematoden zu sehen. Die Verschiebung ist der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mittelpunkten (grüne Punkte) der Bahnkurve des Nematoden. Die Verschiebung zwischen zwei Kameraaufnahmen entspricht der Länge bzw. dem Betrag des Verschiebungsvektors (schwarze Vektoren).

Die Verschiebung beschreibt somit die Positionsänderung der Nematoden bei ihrer Fortbewegung durch die viskoelastischen Umgebungen auf unterschiedlichen Zeitskalen (abhängig vom Aufnahme-Verfahren). Mit den Verteilungsfunktionen kann die Gleichmäßigkeit der einzelnen Fortbewegungsschritte untersucht werden. Je symmetrischer die Bewegung der Nematoden in einer Agarose-Lösung ist, desto kompakter ist die dazugehörige Verteilungsfunktion seiner Verschiebungen.

Anomalie-Parameter der Tracking-Sequenz:

Der Anomalie-Parameter α einer Tracking-Sequenz ergibt sich mit dem Ansatz

$$MSD(t) \sim t^\alpha \quad (20)$$

aus dem zeitlichen Verlauf der mittleren quadratischen Verschiebung der Mittelpunkte (Steigung der Ausgleichsgeraden, siehe Abbildung 58). Wie mit der obigen Formel ersichtlich wird, bestimmt der Anomalie-Parameter das zeitliche Wachstum des MSD's. D. h. je größer der Anomalie-Parameter ist, desto schneller wächst das MSD mit der Zeit. Das MSD ist wiederum ein Maß für die Effizienz der Nematoden-Bewegung in den verschiedenen Agarose-Lösungen. Je größer der Wert des MSD's zu einem bestimmten Zeitpunkt ist, desto größer ist die Fläche, die (höchstwahrscheinlich) von den Nematoden bis zu diesem Zeitpunkt durchstreift wurde. Daher wurde der Anomalie-Parameter auch für die Bewegungsanalyse der Tracking-Sequenzen verwendet, um zu überprüfen, ob sich der getrackte Nematode in der Sequenz fortbewegt hat. Mit dem Anomalie-Parameter lässt sich ebenfalls die Art der Diffusion (bspw. Subdiffusion) bestimmen (siehe Grundlagenteil).

Mean first passage time:

Die 'mean first passage time' beschreibt, wie lange die Nematoden im Durchschnitt benötigen, um das erste Mal einen bestimmten Abstand von ihrem aktuellen Standort zu erreichen. (siehe Abbildung 60).

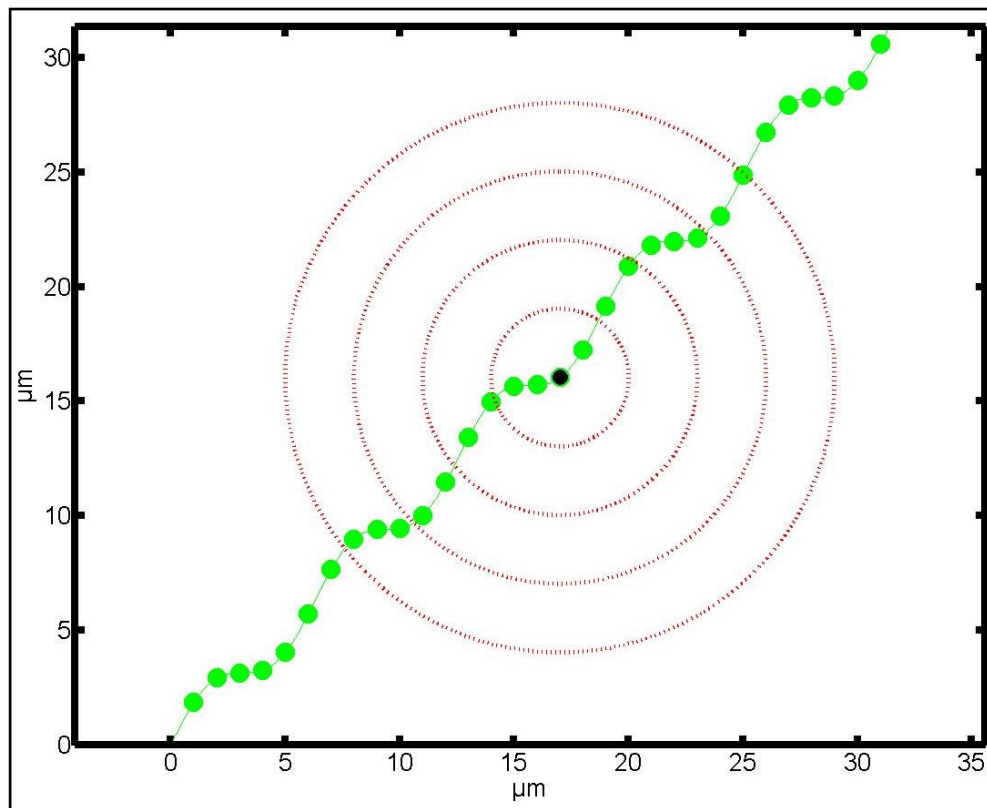


Abbildung 60: Ausschnitt der Bahnkurve eines Nematoden. Die 'first passage time' des betrachteten Mittelpunkts (schwarzer Punkte) sind die Zeiten, die der Nematode benötigt, um das erste Mal bestimmte Abstände (rote Kreise) von diesem Punkt zu überschreiten. Diese Zeiten werden für möglichst viele Abstände berechnet. Wird jeder Mittelpunkt (grünen Punkte) der Bahnkurve als Startpunkt dieser Berechnung herangezogen und anschließend der Mittelwert der benötigten Zeit für jeden Abstand berechnet, so erhält man die 'mean first passage time'.

Berechnung der 'mean first passage time'

- i) Im ersten Schritt werden die einzelnen Verschiebungen der Mittelpunkte für alle Zeitdifferenzen berechnet. Ist die Bahnkurve einer Tracking-Sequenz gegeben mit $X = \{\vec{x}(t_1), \vec{x}(t_2), \dots, \vec{x}(t_N)\}$, dann ist die Verschiebung des Mittelpunkts $\vec{x}(t_i)$ über eine beliebige Zeitdifferenz: $\Delta t_k = k \cdot \Delta t_0$ gegeben mit:

$$V_i(k \cdot \Delta t_0) = |\vec{x}(t_{i+k}) - \vec{x}(t_i)| \quad k = 1, 2, 3, \dots \quad (20)$$

, wobei Δt_0 die Zeitdifferenz zwischen zwei Aufnahmen der Kamera ist.

- ii) Im nächsten Schritt werden die Zeiten T_n bestimmt, die der Nematode benötigt hat, um die Abstände d_n vom Mittelpunkt $\vec{x}(t_i)$ das erste Mal zu überschreiten. Die Abstände d_n starten mit $20 \mu\text{m}$ und wachsen in $10 \mu\text{m}$ Schritten ($d_1 = 20 \mu\text{m}$, $d_2 = 30 \mu\text{m}$, $d_3 = 40 \mu\text{m}$, ...). Der Abstand wird solange schrittweise erhöht, bis alle Punkte der Bahnkurve innerhalb des Abstands d_n sind. Diese 'first passage time' wird für jeden Mittelpunkt der Bahnkurve bestimmt, d. h. für jeden Mittelpunkt $\vec{x}(t_i)$ werden die Zeiten T_n bestimmt.
- iii) Im letzten Schritt werden für die einzelnen Abstände d_n die Mittelwerte der 'first passage time' berechnet, d. h. für jedes n wird der Mittelwert von T_n berechnet. Dadurch erhält man die 'mean first passage time' einer Tracking-Sequenz.
- iv) Um die Bewegung der Nematoden in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen vergleichen zu können, wird die Steigung der Ausgleichsgeraden im loglog-Plot für jede einzelne Tracking-Sequenz berechnet. (siehe Abbildung 61). Je größer diese Steigungen in einer Agarose-Lösung sind, desto länger benötigen die Nematoden im Schnitt, um in dieser Umgebung eine gewisse Distanz zurückzulegen (bzw. das erste Mal zu überwinden).

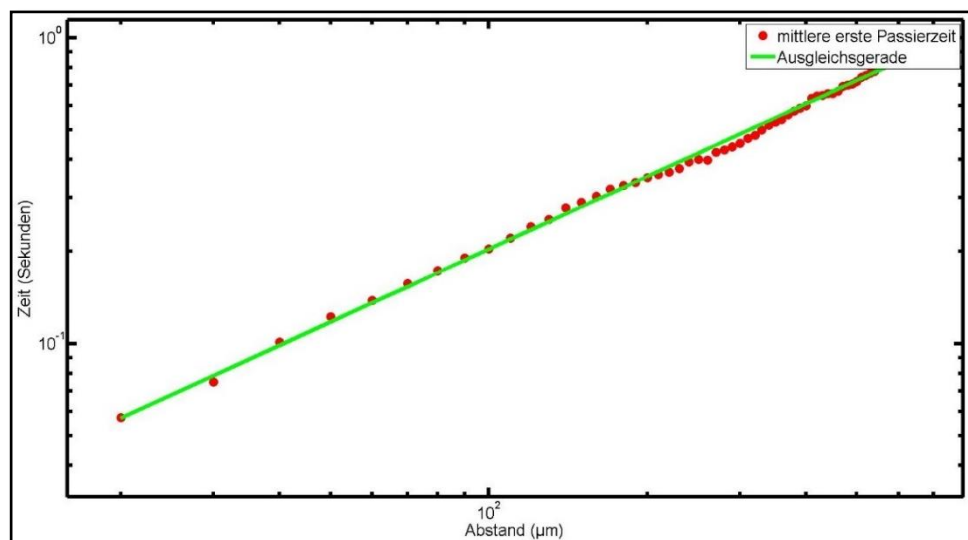


Abbildung 61: Die 'mean first passage time' (rot) und die dazugehörige Ausgleichsgerade (grün) einer Tracking-Sequenz. Der Abstand der einzelnen Fitpunkte voneinander wächst exponentiell, so dass ihr Abstand im loglog-Plot konstant bleibt (vgl. Fit des MSD's). Durch den Vergleich der mittleren Steigung der Ausgleichsgeraden kann die Bewegung der Nematoden in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen miteinander verglichen werden.

Wegeffizienz der Bewegung

Die mittlere Wegeffizienz beschreibt, wie geradlinig (bzw. zielstrebig) sich die Nematoden auf unterschiedlichen Zeitskalen bewegen (siehe Abbildung 62) und ist eine eigenständig definierte Messgröße, um die Bahnkurven der Nematoden in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen besser charakterisieren zu können. Ist die Bahnkurve einer Tracking-Sequenz gegeben mit $X = \{\vec{x}(t_1), \vec{x}(t_2), \dots, \vec{x}(t_N)\}$, dann ist die Wegeffizienz w_{eff} für einen beliebigen Zeitschritt $\Delta t = t_{i+k} - t_i$ definiert mit:

$$w_{eff}(\Delta t) = \frac{dist(\Delta t)}{w_{zu}(\Delta t)} \quad (21)$$

, wobei für den Abstand $dist$ und den zurückgelegten Weg w_{zu} des Nematoden gilt:

$$dist(\Delta t) = |\vec{x}(t_{i+k}) - \vec{x}(t_i)| \quad \text{mit} \quad i, k = 1, 2, 3, \dots$$

$$w_{zu}(\Delta t) = \sum_j |\vec{x}(t_{j+1}) - \vec{x}(t_j)| \quad (22)$$

Die Wegeffizienz für diesen Zeitschritt ergibt sich somit aus dem Verhältnis von

- Abstand zum Startpunkt ($dist$) und
- zurückgelegtem Weg (w_{zu}).

Der zurückgelegte Weg ergibt sich wiederum aus der Summe der Teilstrecken zwischen dem Anfangspunkt $\vec{x}(t_i)$ und dem Endpunkt $\vec{x}(t_{i+k})$ der betrachteten Bewegung. Die Wegeffizienz besitzt keine Einheit und kann nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Solange sich der Nematode entlang einer Geraden bewegt, ist seine Wegeffizienz für alle Zeitschritte 1. Kommt der Nematode wieder an den Startpunkt der Bewegung zurück, so ist seine Wegeffizienz für diesen Zeitschritt 0.

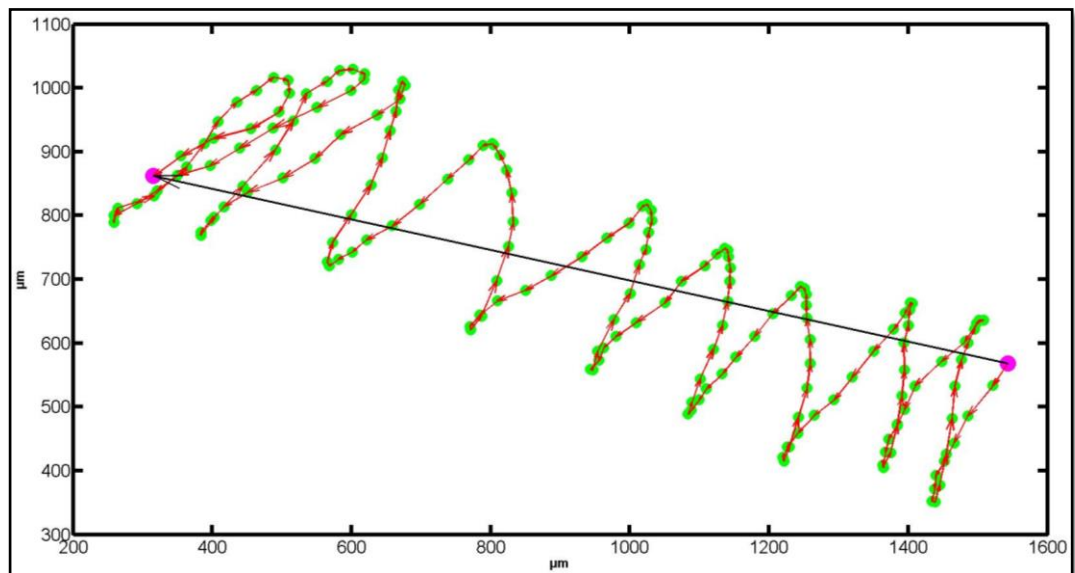


Abbildung 62: Die mittlere Wegeffizienz ist eine eigenständig definierte Messgröße zur Beschreibung der Bahnkurven in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen. Die Wegeffizienz zum Zeitpunkt t entspricht dem Verhältnis zwischen dem Abstand vom Startpunkt (Länge des schwarzen Vektors) und den dafür zurückgelegten Weg (Summe der Längen der roten Vektoren). Wird die Wegeffizienz für jeden Mittelpunkt der Bahnkurve berechnet und anschließend der Mittelwert für jeden Zeitschritt der Wegeffizienz gebildet, erhält man die mittlere Wegeffizienz (in Abhängigkeit der Zeit) einer Tracking-Sequenz.

Für die Berechnung der mittleren Wegeffizienz einer Tracking-Sequenz wird für jeden Zeitschritt Δt die Wegeffizienz $w_{eff}(\Delta t)$ berechnet. Dabei wird jeder Punkt auf der Bahnkurve einmal als Startpunkt der Bewegung angesehen und die Wegeffizienz von diesem Punkt aus für die unterschiedlichen Zeitschritte berechnet. Anschließend wird der Mittelwert der Wegeffizienz für die unterschiedlichen Zeitschritte berechnet. D. h. man erhält für jede Tracking-Sequenz eine mittlere Wegeffizienz in Abhängigkeit der Zeit.

Zum Vergleich der Nematoden-Bewegung in den verschiedenen Umgebungen wird der Durchschnitt der mittleren Wegeffizienz für Zeiten größer als 4 Sekunden verwendet (siehe Abbildung 63). Dies ist möglich, da nach spätestens dieser Zeit (deutlich größer als die Periodendauer der Bewegung) die mittlere Wegeffizienz einer Tracking-Sequenz zeitlich (nahezu) konstant bleibt. Je größer die mittlere Wegeffizienz ist, desto kleiner sind im Durchschnitt die Umwege, die der Nematode bei seiner Fortbewegung macht.

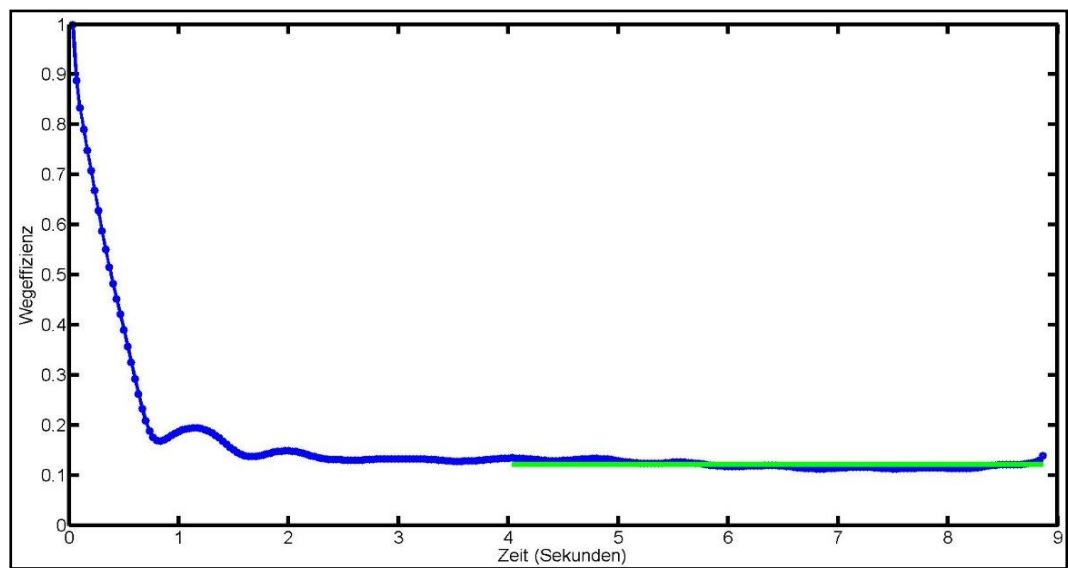


Abbildung 63: mittlere Wegeffizienz einer Tracking-Sequenz (blau). Zum Vergleich der Nematoden-Bewegung in den unterschiedlichen Umgebungen wird von jeder Tracking-Sequenz der Durchschnitt der mittleren Wegeffizienz für Zeiten größer als 4 Sekunden verwendet (grüne Linie).

b) Physikalische Größen zur Beschreibung der Körperform

mittlere Krümmung der Nematoden:

Die mittlere Krümmung eines Nematoden ergibt sich aus dem Durchschnitt der lokalen Krümmungen seiner Mittellinie (siehe Abbildung 64). Für die Berechnung der lokalen Krümmungen wird zunächst die Mittellinie des Nematoden in einzelne Segmente aufgeteilt, wobei jedes Segment eine Länge von $10\text{ }\mu\text{m}$ besitzt. Anschließend wird an jedes Segment ein Kreis gefittet. Der Kehrwert des Radius ist die Krümmung eines Segments und der Mittelwert der einzelnen Segment-Krümmungen ist die mittlere lokale Krümmung des Nematoden. Diese wird für jede Aufnahme einer Tracking-Sequenz berechnet. Die erstellten Verteilungsfunktionen beinhalten somit alle (mittleren lokalen) Krümmungen der Nematoden, die sie bei ihrer Fortbewegung in den unterschiedlichen Umgebungen machen.

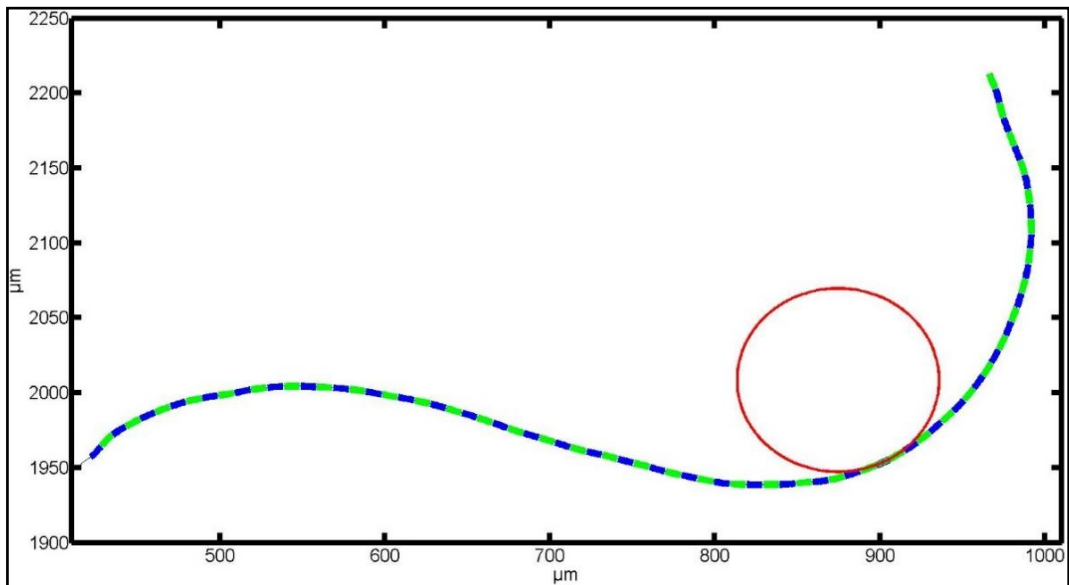


Abbildung 64: mittlere Krümmung eines Nematoden. Für die Berechnung der mittleren Krümmung wird die Mittellinie des Nematoden in gleichlange Segmente aufgeteilt (grün und blau). Anschließend wird jedes Segment mit einem Kreis gefittet. Der Kehrwert des Radius entspricht der lokalen Krümmung der Mittellinie. Die mittlere Krümmung ergibt sich dann aus dem Mittelwert aller lokalen Krümmungen des Nematoden in einer Aufnahme.

Periodendauer der Bewegung:

Die Nematoden bewegen sich durch eine periodische Verformung ihres Körpers fort (siehe Kapitel 2.2.3). Die Periodendauer dieser Bewegung ist diejenige Zeit, die ein Nematode für einen vollständigen Bewegungszyklus benötigt. Um die Periodendauer der Nematoden-Bewegung bestimmen zu können, wurde (eigenständig) ein Verfahren entwickelt, mit dem die mittlere Periodendauer in allen Agarose-Lösungen bestimmt werden kann.

a) Ausrichten der Mittellinien

Im ersten Schritt werden alle Mittellinien einer Tracking-Sequenz passend zueinander ausgerichtet (siehe Abbildung 65). Dafür werden zunächst in den ersten beiden Aufnahmen die folgenden Abstände zwischen den Anfangs- und Endpunkten der beiden Mittellinien berechnet:

d_1 : Anfangspunkt 1 \rightarrow Anfangspunkt 2

d_2 : Anfangspunkt 1 \rightarrow Endpunkt 2

d_3 : Endpunkt 1 \rightarrow Anfangspunkt 2

d_4 : Endpunkt 1 \rightarrow Endpunkt 2

Aus diesen Abständen ergeben sich 4 Möglichkeiten:

- i) $d_2 \geq d_1 \wedge d_3 \geq d_4 \rightarrow$ Mittellinie 2 wird nicht invertiert
- ii) $d_1 > d_2 \wedge d_4 > d_3 \rightarrow$ Mittellinie 2 wird invertiert*
- iii) $d_1^2 + d_4^2 \leq d_2^2 + d_3^2 \rightarrow$ Mittellinie 2 wird nicht invertiert
- iv) $d_1^2 + d_4^2 > d_2^2 + d_3^2 \rightarrow$ Mittellinie 2 wird invertiert

*Die Reihenfolge der einzelnen Punkte der Mittellinie wird umgedreht, d. h. sind die Punkte der Mittellinie gegeben mit: $\{P_1, P_2, \dots, P_{N-1}, P_N\}$, dann ergibt sich die neue Reihenfolge der Punkte nach dem folgenden Prinzip:

$$(P_1 \rightarrow P_N), (P_2 \rightarrow P_{N-1}), \dots, \dots, (P_{N-1} \rightarrow P_2), (P_N \rightarrow P_1)$$

(Es kommen keine neuen Punkte hinzu, nur die Reihenfolge der Punkte ändert sich.)

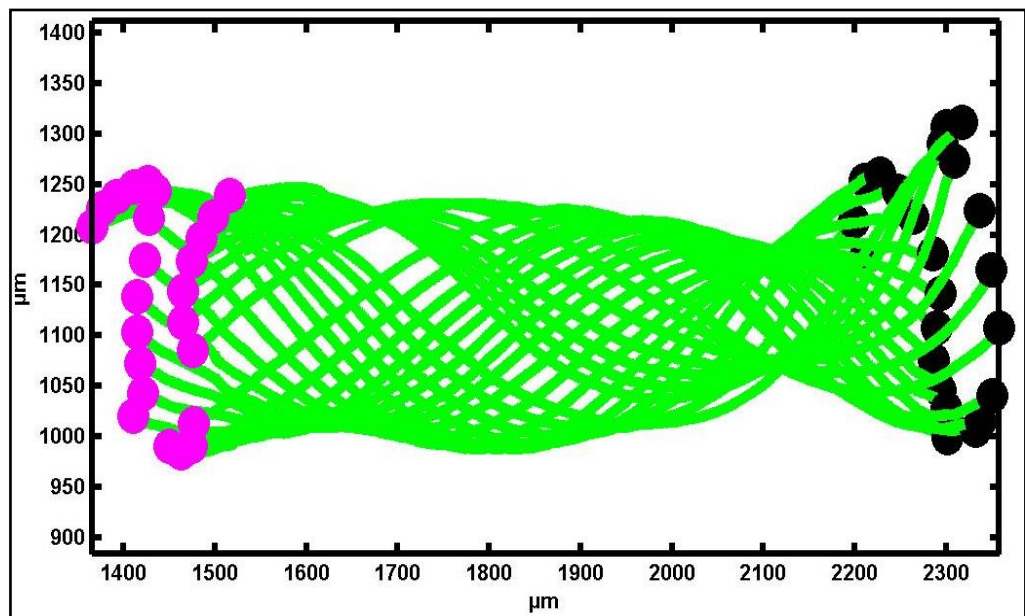


Abbildung 65: In der obigen Abbildung sind (einige) ausgerichtete Mittellinien (grüne Linien) eines Nematoden in einer Tracking-Sequenz zu sehen. Nach dem Ausrichten ist der Abstand der Anfangspunkte (schwarze Punkte) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mittellinien immer kleiner als der Abstand zwischen dem Anfangspunkt (schwarzer Punkt) der einen und dem Endpunkt (violetter Punkt) der anderen Mittellinie. Das Gleiche gilt für die Endpunkte (violette Punkte) der Mittellinien.

Im nächsten Schritt werden diese vier Abstände (d_1, \dots, d_4) zwischen den Anfangs- und Endpunkten der Mittellinien in der zweiten und dritten Aufnahme der Sequenz berechnet. Je nachdem wie diese Abstände sind, wird die Mittellinie in der dritten Aufnahme invertiert oder nicht. Nach diesem Prinzip wird nun Aufnahme für Aufnahme verfahren, bis alle Mittellinien der Tracking-Sequenz ausgerichtet sind. Nach dem Ausrichten ist der Abstand der beiden Anfangspunkte zweier aufeinanderfolgender Mittellinien immer kleiner als der Abstand zwischen dem Anfangspunkt der einen und dem Endpunkt der anderen Mittellinie.

b) Aufteilen der Mittellinie

Nach dem Ausrichten werden auf jeder Mittellinie der Tracking-Sequenz 7 Punkte bestimmt (siehe Abbildung 66 a, siehe Tabelle 3). Zu diesen 7 Punkten auf der Mittellinie gehören:

- i) Anfangspunkt, Endpunkt und Mittelpunkt.
- ii) Zwei weitere Punkte befinden sich in der Mitte zwischen Anfangs- bzw. Endpunkt und Mittelpunkt.
- iii) Die letzten beiden Punkte befinden sich jeweils in der Mitte zwischen einem in (ii) beschriebenen Punkt und dem Mittelpunkt.

Die Positionen dieser 7 Punkte lässt sich mit Hilfe der Länge der Mittellinie anschaulich beschreiben. Die Länge der Mittellinie ergibt sich aus der Summe der Abstände ihrer Punkte:

$$L = \sum_{i=1}^{N-1} |\vec{P}_{i+1} - \vec{P}_i| \quad (23)$$

, wobei \vec{P}_i ein Punkt auf der Mittellinie ist. Für die Positionen der 7 Punkte auf der Mittellinie gilt nun:

Punkt:	1	2	3	4	5	6	7
Position:	0·L	0,25·L	0,375·L	0,5·L	0,675·L	0,75·L	1·L

Tabelle 3: Die Positionen der 7 Punkte entlang der Mittellinie.

c) Aufspannen der Vektoren

Diese 7 Punkte auf jeder Mittellinie sind die Anfangs- und Endpunkte von insgesamt 6 Vektorpaaren (siehe Abbildung 66 a). Die beiden Vektoren eines Vektorpaars besitzen immer denselben Anfangspunkt und die Endpunkte dieser beiden Vektoren haben immer die gleiche Entfernung vom Startpunkt. Mit der zusätzlichen Forderung, dass die beiden Endpunkte mindestens die halbe Länge der Mittellinie voneinander entfernt sein müssen, ergeben sich aus den 7 Punkten insgesamt 6 Vektorpaare (VP).

- VP₁: Startpunkt: P₄ (0,5·L)* → Endpunkte: P₁ (0·L) und P₇ (1·L)
- VP₂: Startpunkt: P₄ (0,5·L) → Endpunkte: P₂ (0,25·L) und P₆ (0,75·L)
- VP₃: Startpunkt: P₃ (0,375·L) → Endpunkte: P₁ (0·L) und P₆ (0,75·L)
- VP₄: Startpunkt: P₅ (0,675·L) → Endpunkte: P₂ (0,25·L) und P₇ (1·L)
- VP₅: Startpunkt: P₂ (0,25·L) → Endpunkte: P₁ (0·L) und P₄ (0,5·L)
- VP₆: Startpunkt: P₆ (0,75·L) → Endpunkte: P₄ (0,5·L) und P₇ (1·L)

*In Klammern steht die Position des Punkts auf der Mittellinie.

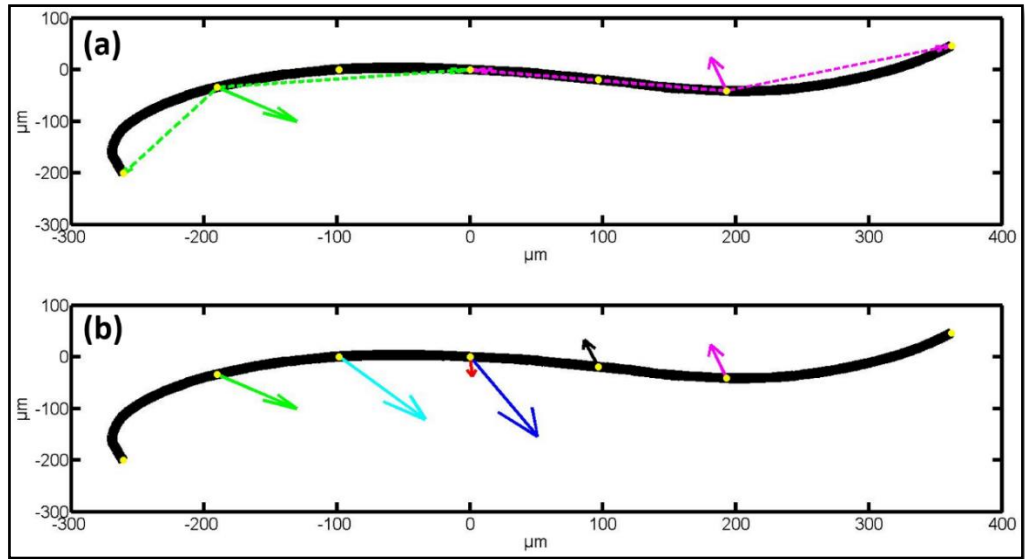


Abbildung 66: aufgespannte Vektoren entlang der Mittellinie **(a)** Auf jeder Mittellinie werden zunächst 7 Punkte (gelb) bestimmt. Diese Punkte sind die Start- und Endpunkte von 6 Vektorpaaren (gestrichelte Vektoren, nur 2 der 6 Vektorpaare sind eingezeichnet). **(b)** Durch Addition der beiden Vektoren der Vektorpaare ergeben sich die zur Berechnung der Periodendauer benötigten Vektoren. Aus der zeitlichen Änderung dieser 6 Vektoren kann die Periodendauer der Bewegung bestimmt werden.

Im nächsten Schritt werden die beiden Vektoren der Vektorpaare addiert. Daraus ergeben sich sechs Vektoren, deren Anfangspunkte auf der Mittellinie liegen (siehe Abbildung 66 b). Mit diesen Vektoren kann die Änderung der Körperform während der Fortbewegung des Nematoden optimal untersucht werden.

d) zeitliche Änderung der Vektoren:

Um die Periodendauer der Nematoden-Bewegung bestimmen zu können, wird die zeitliche Änderung dieser 6 Vektoren betrachtet (siehe Abbildung 67 a). Ist $\vec{V}_i(n)$ der i -te Vektor auf der Mittellinie in der n -ten Aufnahme einer Tracking-Sequenz, dann ist der Winkel α_i zwischen $\vec{V}_i(n)$ und $\vec{V}_i(n+1)$ gegeben mit:

$$\alpha_i(n) = \arccos\left(\frac{\vec{V}_i(n) \cdot \vec{V}_i(n+1)}{|\vec{V}_i(n)| \cdot |\vec{V}_i(n+1)|}\right) \quad (24)$$

Damit können jeder Kontur n (Kontur des Nematoden in der n -ten Aufnahme) einer Tracking-Sequenz 6 verschiedene Winkel $\alpha_i(n)$ mit $i = 1, 2, \dots, 6$ zugeordnet werden. Bei der Bewegung des Nematoden bleiben diese Winkel zeitlich konstant und sehr klein, bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich das Vorzeichen der (lokalen) Körperkrümmung ändert. An diesem Punkt haben die Winkel ein deutliches Maximum und werden anschließend sofort wieder klein (siehe Abbildung 67 b). Um diesen Vorzeichenwechsel der Körperkrümmung möglichst genau bestimmen zu können, wird das zeitliche Verhalten von 6 Vektoren entlang der Mittellinie betrachtet. Dies ist nötig, da der Nematode bei der Fortbewegung nicht immer den gesamten Körper periodisch bewegt, sondern je nach Umgebung, beschränkt sich die Periodizität der Bewegung auf einen bestimmten Abschnitt seines Körpers. Durch die Auswertung von 6 Vektoren entlang

der Mittellinie, lässt sich die Periodendauer der Fortbewegung in (nahezu) allen Umgebungen (von flüssig bis fest) bestimmen.

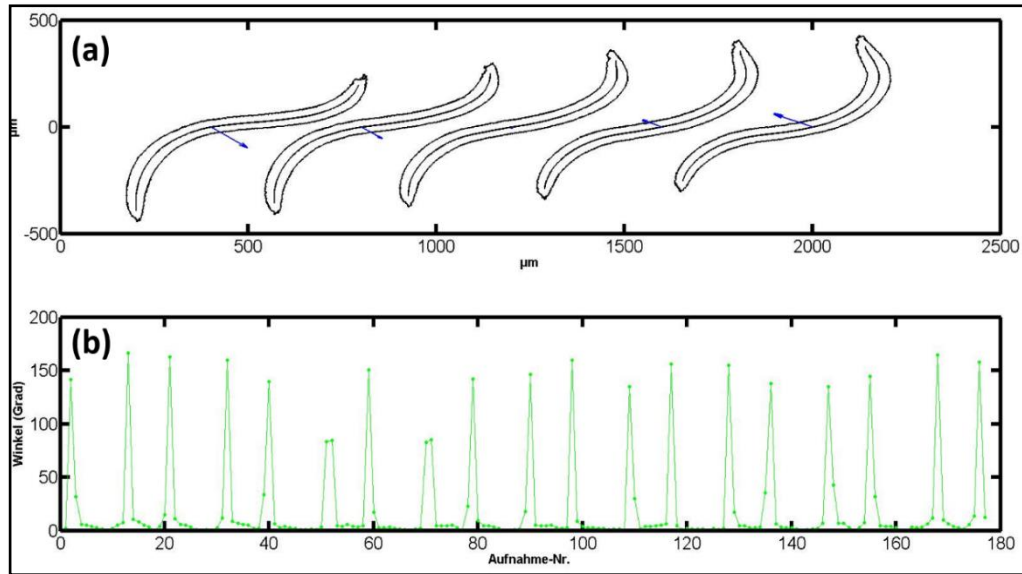


Abbildung 67: Bestimmung der Periodendauer (a) Ändert sich bei der Fortbewegung des Nematoden das Vorzeichen seiner (lokalen) Krümmung, ändert sich auch die Richtung, in die der Vektor (blau) zeigt. (b) Die zeitliche Änderung des Winkels zwischen zwei aufeinanderfolgenden Vektoren während einer gesamten Tracking-Sequenz. Auffällig sind die deutlichen Maxima, jedes Mal wenn sich das Vorzeichen der (lokalen) Körperkrümmung des Nematoden ändert.

Als Nächstes werden aus den Winkeln α_i die (Kontroll-)Funktionen f_i erstellt. Dafür werden die 6 Winkel α_i in jeder Aufnahme n nach dem folgenden Prinzip addiert:

$$\begin{array}{lll}
 f_i(n) = \alpha_i(n) & \text{für} & n = 1 \\
 f_i(n) = \alpha_i(n-1) + \alpha_i(n) & \text{für} & \alpha_i(n) \geq \alpha_i(n-1) \\
 f_i(n) = 0 & \text{für} & \alpha_i(n) < \alpha_i(n-1)
 \end{array}$$

Diese Addition der Winkel wird deshalb durchgeführt, da sich das gesuchte Maximum manchmal auf zwei aufeinanderfolgende Aufnahmen verteilt. In diesem Fall besitzen die Winkel α_i zwei (kleinere) Maxima für nur einen einzigen Vorzeichenwechsel der Krümmung. Mit der neuen Funktion f_i wird dieser Effekt vermieden.

e) Suchen der Maxima:

Nach der Addition werden in jeder Funktion f_i diejenigen Aufnahmen n' gesucht, deren Funktionswerte $f_i(n')$ größer als 90° sind. Die jeweilige Funktion f_i wird an diesen Stellen auf 90° und alle anderen Funktionswerte werden auf 0° gesetzt, d. h.

$$\begin{array}{ll}
 f_i(n) = 90^\circ & \text{wenn } f_i(n) \geq 90^\circ \\
 f_i(n) = 0^\circ & \text{sonst}
 \end{array}$$

Damit besitzt jede Funktion f_i nach diesem Schritt nur noch die Werte 0° und 90° (siehe Abbildung 68).

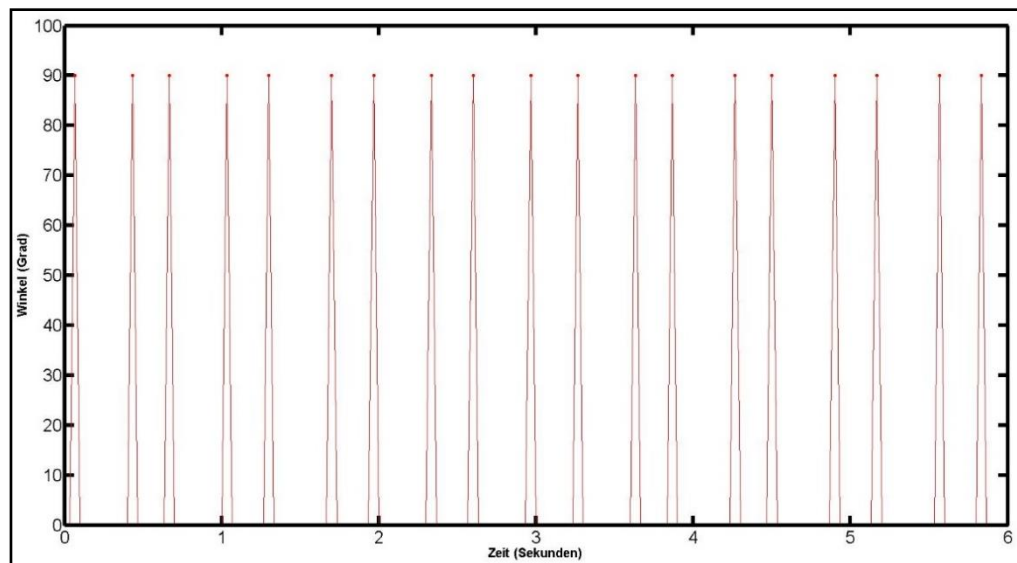


Abbildung 68: Graf der Funktion f_i . Die Periodendauern der Nematoden-Bewegung einer Tracking-Sequenz ergeben sich aus den zeitlichen Abständen der einzelnen Peaks. Der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peaks entspricht einer halben Periodendauer.

f) Auswahl der Funktion:

Im letzten Schritt wird noch diejenige Funktion f_i gesucht, deren Peaks am gleichmäßigsten entlang der Zeitachse (x-Achse) verteilt sind. Dazu wird in jeder Funktion f_i

- der Mittelwert der einzelnen Abstände der Peaks
- durch die Standardabweichung dieser Abstände geteilt.

Die Funktion f_i mit dem kleinsten Wert wird für die Bestimmung der Periodendauern in der Tracking-Sequenz verwendet. Der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peaks entspricht einer halben Periodendauer. D. h. die einzelnen Periodendauern einer Tracking-Sequenz ergeben sich aus den Abständen der Peaks von f_i auf der Zeitachse (siehe Abbildung 68).

Aus der Periodendauer lassen sich weitere Größen zur Beschreibung der Nematoden-Bewegung ableiten. Hierfür müssen zunächst die Verschiebungsvektoren der Perioden definiert werden.

Verschiebungsvektor einer Periode:

Der Verschiebungsvektor einer Periode ist definiert als der Differenzvektor zwischen zwei aufeinanderfolgenden Startpunkten einer Periode (siehe Abbildung 69). Die Startpunkte der Perioden sind die Mittelpunkte (des Nematoden) in denjenigen Aufnahmen n , in denen der Funktionswert von f_i gleich 90° und n ungerade ist, d. h.

$$f_i(n) = 90^\circ \quad \wedge \quad n \text{ ist ungerade}$$

Als Startpunkte einer Periode werden nur ungerade Werte für n verwendet, da die Funktion f_i nach jeder Halbperiode ein Maximum hat.

i) Periodenlänge

Die Periodenlänge ist die Verschiebung des Mittelpunkts während einer vollständigen Periode. Sie entspricht der Strecke, die ein Nematode während einer Periodendauer zurücklegt. Die Periodenlänge ist der Betrag des Verschiebungsvektors der entsprechenden Periode.

ii) Periodenwinkel

Der Periodenwinkel beschreibt die Richtungsänderung der Bewegung zwischen zwei Perioden. Der Periodenwinkel entspricht dem Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verschiebungsvektoren.

iii) maximale Auslenkung

Die maximale Auslenkung entspricht der Amplitude der Bahnkurve während einer Periode. Für die Berechnung wird zwischen dem Start- und Endpunkt¹⁷ einer Periode eine Gerade gezogen und der Abstand aller Mittelpunkte der Periode zu dieser Geraden berechnet. Der größte Abstand, den ein Mittelpunkt der Periode von dieser Geraden besitzt, ist die maximale Auslenkung der Periode.

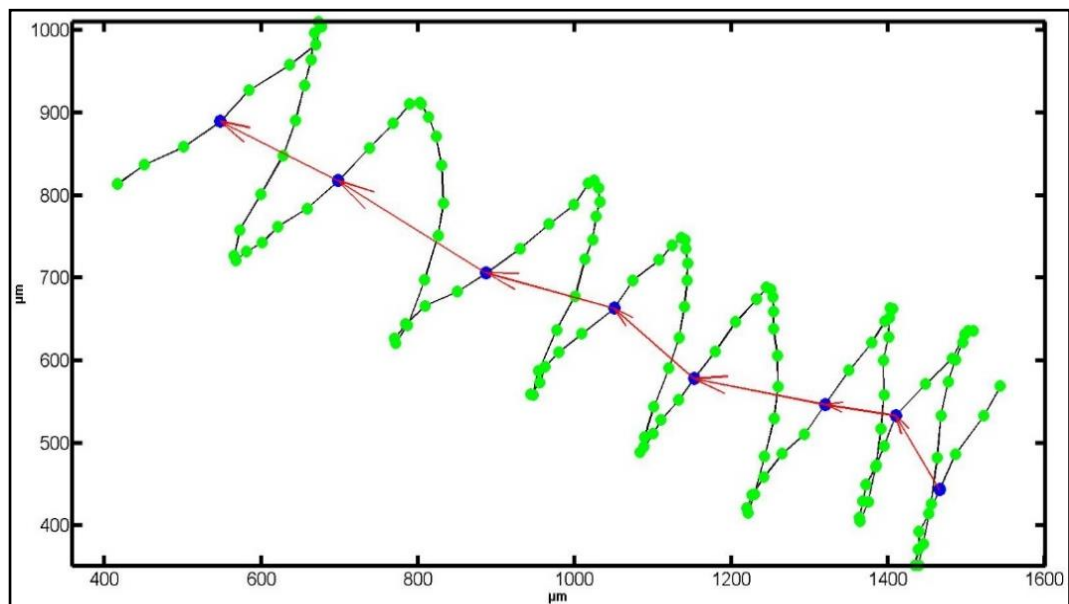


Abbildung 69: Die Bahnkurve eines Nematoden in einer 0,1% -igen Agarose-Lösung. Die Mittelpunkte des Nematoden sind in Grün eingezeichnet. Die blauen Punkte sind die Start- bzw. Endpunkte der einzelnen Perioden. Die Verschiebungsvektoren der Perioden sind in Rot eingezeichnet. Die gezeigte Tracking-Sequenz wurde mit einer Aufnahme-Geschwindigkeit von 30 Bildern pro Sekunde aufgenommen (Aufnahme-Verfahren II).

¹⁷ Der Endpunkt einer Periode ist gleichzeitig auch der Anfangspunkt einer neuen Periode.

4.4 Diskussion

Für die vorhandenen Tracking-Systeme existieren bereits verschiedene Tracking-Programme, die in unterschiedlichen Programmiersprachen geschrieben sind. Beispiele für solche Tracking-Programme sind:

- a) der „OptoTracker“ von Gottschalk lab (geschrieben in Matlab)
- b) der „The Multi Worm Tracker“ von Kerr lab (geschrieben in LabVIEW)
- c) der „CoLBERT“¹⁸ von Samuel lab (geschrieben in C)

Die wohl bekannteste Tracking-Software ist der „Worm Tracker 2.0“ von Schafer lab¹⁹ (Back, Feng, Cosman, Silver, & Schafer, 2002). Die Software kann für statische und dynamische Tracking-Systeme verwendet werden und wird über eine eigene Benutzeroberfläche (GUI) gesteuert. Zusätzlich zu der (reinen) Tracking-Software gibt es auch eine Toolbox für die Analyse der aufgenommenen Daten. Mit dieser Toolbox können physikalische Messgrößen wie die Größe, Länge und Helligkeit der Nematoden untersucht werden. Mit dem „Worm Tracker 2.0“ lassen sich jedoch ausschließlich einzelne Nematoden tracken (Single-Wurmtracking). Die Software ist geschrieben in Java und Matlab und ist frei für den Gebrauch (Freeware).

Eine Software für das Tracken mehrerer Nematoden gleichzeitig (Multi-Wurmtracking) ist der „The Multi Worm Tracker“ von Kerr lab²⁰. Dank eines ausgefeilten Tracking-Mechanismus ist die Software in der Lage, bis zu 120 Nematoden gleichzeitig zu tracken. Damit kann das Verhalten der Nematoden (z. B. Chemotaxis) gut untersucht werden (Swierczek, Giles, Rankin, & Kerr, 2011). Geschrieben ist die Software in LabVIEW und C++ und ist ebenfalls Freeware.

Zusammenfassend kann über die bereits vorhandene Tracking-Software gesagt werden: Es existieren bereits mehrere Tracking-Programme, die teilweise (hoch-)spezialisierte Aufgaben erledigen können (z. B. „Multimodal illumination and tracking system“ von Lu lab) oder echte „Tracking-Allrounder“ sind.

Funktionsweise und Vorteile unseres Software-Konzepts:

Das von uns entwickelte Software-Konzept verbindet eine textbasierte Programmiersprache (Matlab) mit einer grafischen Programmierung (LabVIEW), wobei die Kommunikation der beiden Programme über einen speziellen Compiler²¹ für .m-Dateien erfolgt (siehe Abbildung 70). Damit lassen sich die Vorteile beider Programmiersprachen (textbasiert und grafisch) kombinieren, was einige Vorteile bei der Programmierung von Tracking-Systemen mit sich bringt:

- a) Mit dem von uns verwendeten Software-Konzept können von der Aufnahme über die Aufbereitung bis hin zur Auswertung alle Programme mit einem einheitlichen Programmierstil geschrieben werden.
- b) Mit der eigenständig entwickelten Methode des „eingefrorenen Bilds“, den Echtzeitplots und den Benutzeroberflächen der einzelnen Programme lassen sich für die Aufnahme und Auswertung immer die optimalen Einstellungen (zügig) finden (siehe Abbildung 71).

¹⁸ „control locomotion and behavior in real time“ (Leifer, Fang-Yen, Gershow, Alkema, & Samuel, 2011)

¹⁹ Die Software ist zu finden unter: <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/wormtracker/>

²⁰ Die Software ist zu finden unter: <http://sourceforge.net/projects/mwt/>

²¹ „NI LabVIEW MathScript RT Module“ von National Instruments

- c) Die Programmierung erlaubt sowohl statisches als auch dynamisches Tracking. Darüber hinaus sind Single- und Multi-Wurmtracking möglich. Damit kann die vorhandene Hardware des Wurmtrackers optimal ausgenutzt werden.
- d) Die Programme lassen sich einfach erweitern und es werden nur Programmierkenntnisse in Matlab und LabVIEW benötigt (, d. h. es werden keine speziellen Programmierkenntnisse vorausgesetzt).

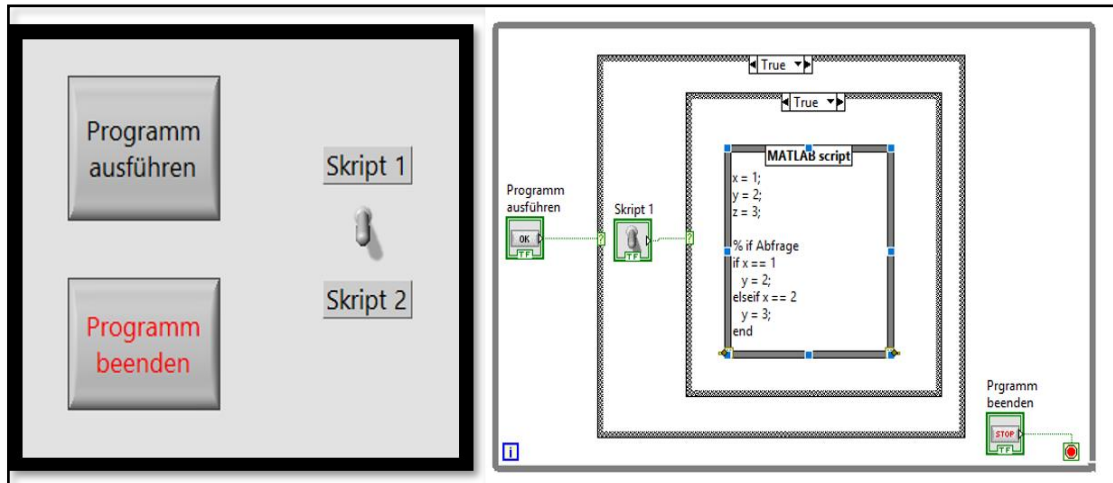


Abbildung 70: Funktionsweise des verwendeten Software-Konzepts mit **(links)** Benutzeroberfläche und **(rechts)** Blockdiagramm. Wird die Software gestartet, wartet das Programm bis der Button 'Programm ausführen' gedrückt wird. Wird der Button gedrückt, hängt es von der Stellung des Schalters ab, ob das Matlab-Skript 1 (Kasten in der Mitte) oder das Matlab-Skript 2 (verdeckt) ausgeführt wird. Aufgrund der *while*-Schleife kann der Vorgang beliebig oft wiederholt werden. Immer wenn der Button 'Programm ausführen' betätigt wird (und nur dann), wird ein Matlab-Skript ausgeführt. Ob das Skript I oder das Skript II ausgeführt wird, ist abhängig von der Stellung des Schalters. Mit dem Button 'Programm beenden' wird das Programm beendet.

Mit dem von uns verwendeten Software-Konzept wurden für diese Arbeit die nachfolgenden Programme selbstständig entwickelt und programmiert:

- Kalibrierung des Wurmtrackers
- Aufnahme-Verfahren I - III
- Qualitätskontrolle
- Segmentierung
- Zusammenbau (absolute Nematoden-Position)
- Bewegungsanalyse

Da für die restlichen Arbeitsschritte (bzw. Berechnungen) keine weiteren Einstellungen zu finden waren, wurden diese (ausschließlich) mit Matlab programmiert. Beispielsweise konnte mit Matlab ein neues Verfahren zur Bestimmung der Periodendauern der Nematoden-Bewegung in unterschiedlichen Umgebungen entwickelt werden. Die geschriebenen Matlab-Skripte ließen sich gut mit dem verwendeten Software-Konzept verknüpfen.

Fazit:

Mit dem von uns verwendeten Software-Konzept konnte ein neues (ganzheitliches) Verfahren für die Programmierung von Tracking-Systemen etabliert werden.

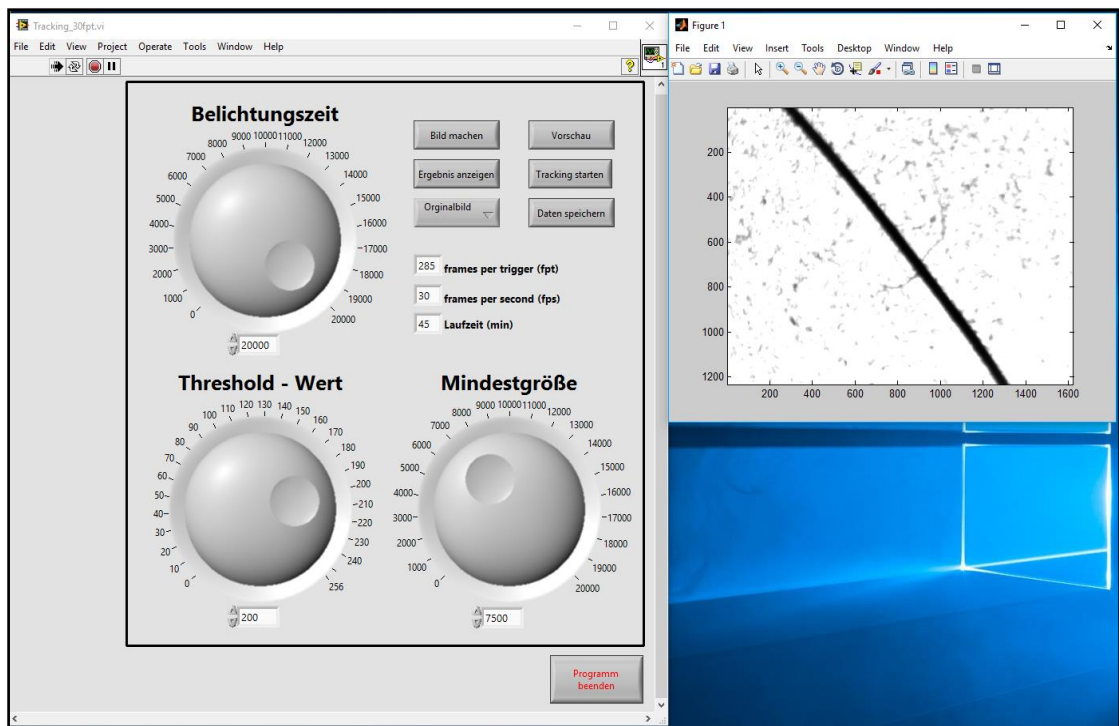


Abbildung 71: grundlegendes Prinzip unseres Software-Konzepts. Auf der linken Seite ist die Benutzeroberfläche (GUI) eines Tracking-Programms zu sehen. Jede Änderung der Einstellungen an den drei Drehreglern (Belichtungszeit, Threshold-Wert und Mindestgröße) wird von der Software automatisch erkannt und das Resultat wird sofort im Echtzeitplot (rechte Seite) angezeigt. Damit ließen sich für das Tracking und die Auswertung die idealen Einstellungen schnell und einfach finden.

5 Experimentelle Resultate und Diskussion

5.1 Messparameter und Kennzahlen der verwendeten Aufnahme-Verfahren

Messparameter:

Die folgenden Parameter sind unabhängig von dem verwendeten Aufnahme-Verfahren für alle Messungen konstant geblieben:

a) Stamm XA3501

Für alle Messungen wurde ausschließlich der *Caenorhabditis elegans* Stamm XA3501 verwendet.

b) Agarose-Lösungen

Alle Agarose-Lösungen (Umgebungen), in denen die Fortbewegung der Nematoden untersucht wurde, bestanden (nur) aus M9-Puffer mit einem unterschiedlichen Anteil an Agarose (von 0 bis 0,5 Gew.-%).

c) Einzelmessungen

Alle (für diese Arbeit) ausgewerteten Messungen waren Einzelmessungen, d. h. für jede Messung wurde der Probenhalter mit nur einem Nematoden präpariert.

d) Messzeit

Die Messzeit jeder Messung betrug (mindestens) 45 Minuten, wobei die ersten 10 Minuten nicht ausgewertet wurden.

e) Temperatur

Alle Messungen wurden in einem klimatisierten Raum bei einer konstanten Temperatur von 21 °C durchgeführt.

f) Nahrung

Auf den Agarplatten, auf denen die Nematoden gezüchtet und gehalten wurden, befand sich immer ausreichend Futter. Dementsprechend wurde ausschließlich die Bewegungsdynamik von gut genährten Nematoden analysiert.

Kennzahlen der verwendeten Aufnahme-Verfahren:

Da für das Mikroskop (Wurmtracker) mehrere Aufnahme-Verfahren entwickelt wurden, konnte die Bewegungsdynamik der Nematoden auf unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen analysiert werden. In der untenstehenden Tabelle sind die wichtigsten Kennzahlen der einzelnen Aufnahme-Verfahren zusammengefasst.

Aufnahme-Verfahren	I	II	III
Aufnahme-Geschwindigkeit [s^{-1}]:	2,8	30	2,1
Anzahl an Nematoden ¹ :	20	20	ca. 30
*Anzahl an Tracking-Sequenzen ² :	452	492	296
*reale Messzeit ³ [min]:	90	45	368
Mindestdauer einer Sequenz [s]:	5	2	25
mittlere Sequenzdauer ⁴ [s]:	12,2	5,5	77,1

mittlere Länge der Bahnkurve ⁵ [mm]:	3,8	2,4	11
Auswertung der Bahnkurven:	Ja	Ja	Ja
Auswertung der Körperform:	Nein	Ja	Nein
verwendeter Probenhalter:	I	I	II

Tabelle 4: Die Kennzahlen der verschiedenen Aufnahme-Verfahren im Vergleich.

- 1) Die Anzahl an Nematoden, die pro Umgebung gemessen wurden.
- 2) Mittelwert aller aufgenommenen Tracking-Sequenzen pro Umgebung.
- 3) Die reale Messzeit ist die Zeit, in der sich ein Nematode im Blickfeld der Kamera befunden hat.
- 4) Die mittlere Sequenzdauer ist die durchschnittliche Zeit, die sich ein Nematode im Blickfeld der Kamera aufhält, bis er es wieder verlässt.
- 5) Die Länge der Bahnkurve ist die Strecke, die ein Nematode im Blickfeld der Kamera zurücklegt.

*Eine genaue Auflistung, getrennt nach Agarose-Konzentration der Umgebung, befindet sich im Anhang unter: 'Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeiten'.

5.2 Analyse der Bahnkurven

*Ausgewertet werden die im vorherigen Kapitel definierten physikalischen Größen zur Beschreibung der Bahnkurven (Kap. 4.3). Die Auswertung erfolgt für alle entwickelten Aufnahme-Verfahren des Wurmtrackers (Kap. 4.1).

5.2.1 Verschiebung der Mittelpunkte

Aufnahme-Verfahren I (Verschiebung):

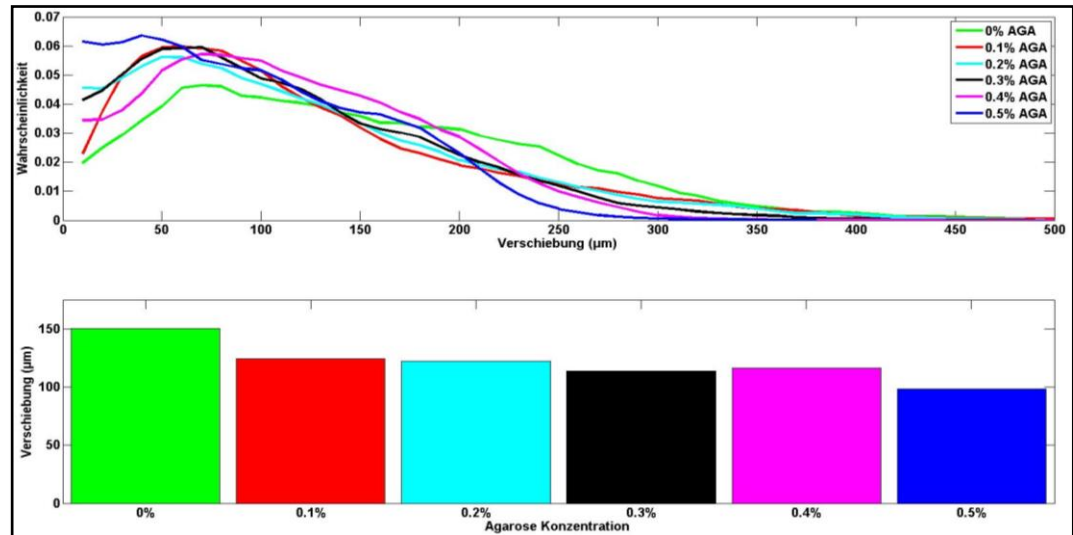


Abbildung 72: (oben) normierte Verteilungen der Verschiebung in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren I).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Verschiebung: [μm]	151	124	122	114	116	98
Standardabweichung: [μm]	92	88	87	75	66	63

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren I)

Beobachtung:

Die mittlere Verschiebung hat ihr Maximum von $151 \mu\text{m}$ in reinem M9-Puffer und ist in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (0,1 % - 0,5 %) deutlich kleiner. In den Lösungen mit mittleren Agarose-Konzentrationen (0,1 % - 0,4 %) ist sie mit steigender Agarose-Konzentration tendenziell leicht abnehmend. Erst bei einem Agarose-Anteil von 0,5 % hat die mittlere Verschiebung nochmals einen etwas größeren Abfall und erreicht ihren Minimalwert von $98 \mu\text{m}$. Mit steigender Agarose-Konzentration der Lösung nimmt auch die Streuung der einzelnen Verschiebungen kontinuierlich ab. Dementsprechend haben die Verschiebungen der Nematoden bei 0,5 % und 0,4 % Agarose-Konzentration die kleinsten Streuungen (ca. $65 \mu\text{m}$). Die Verteilungsfunktionen der Verschiebungen haben für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen (in etwa) die gleiche Form und besitzen ein Maximum (in der Nähe der mittleren Verschiebung).

Fazit:

Bei einer Aufnahme-Geschwindigkeit von 2,8 Bildern pro Sekunde haben die Nematoden in reinem M9-Puffer mit Abstand die größte mittlere Verschiebung, d. h. im Durchschnitt die größte Positionsänderung zwischen zwei Aufnahmen der Kamera. Die Bewegung der Nematoden wird jedoch mit steigender Agarose-Konzentration der Lösung gleichmäßiger, da die Streuung der Verschiebungen kontinuierlich abnimmt und dadurch die einzelnen Schritte der Fortbewegung symmetrischer werden.

Aufnahme-Verfahren II (Verschiebung):

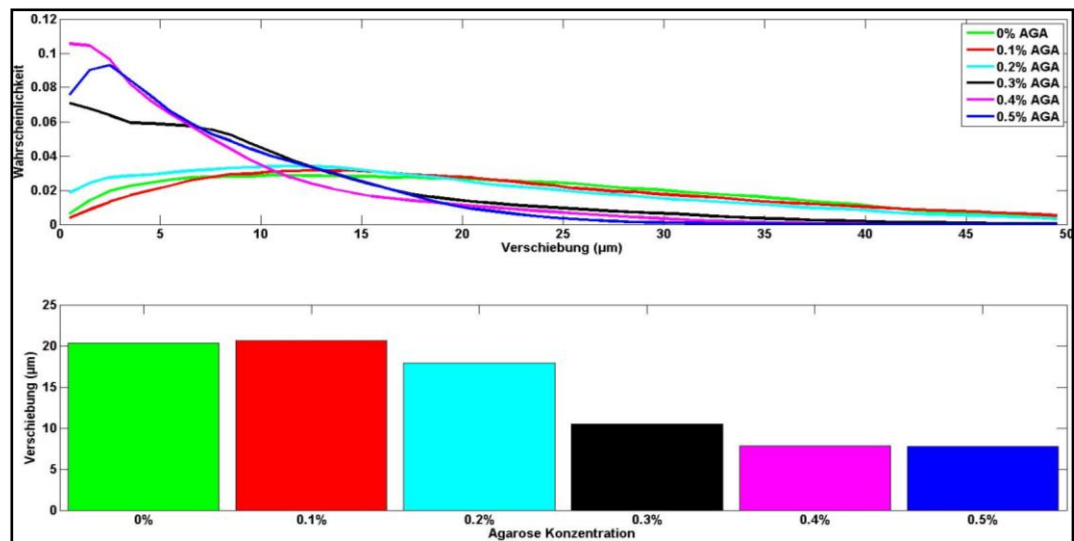


Abbildung 73: (oben) normierte Verteilungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Verschiebung: [μm]	20	21	18	10	8	8
Standardabweichung: [μm]	12	12	12	9	7	6

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II)

Beobachtungen:

In den Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) ist die mittlere Verschiebung der Mittelpunkte konstant bei 20 μm . Mit steigender Agarose-Konzentration werden die mittleren Verschiebungen kleiner. Bei einer Erhöhung des Agarose-Anteils von 0,2 % auf 0,3 % fällt die Verschiebung abrupt auf 10 μm ab. Für die Lösungen mit den größten Agarose-Konzentrationen (0,4 % - 0,5 %) ist die mittlere Verschiebung konstant bei 8 μm . Auch die Form der Verteilungsfunktionen ändert sich mit zunehmenden Agarose-Anteil der Lösung. Bei geringen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,2 %) verteilen sich die einzelnen Verschiebungen über einen großen Bereich ohne deutliches Maximum und die Verteilungen fallen nur langsam für größere Verschiebungen ab. Hingegen fallen die Verteilungen bei höheren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,5 %) zu größeren Verschiebungen hin zügig ab. Daher ist auch die Streuung der einzelnen Verschiebungen in den Lösungen mit hohem Agarose-Anteil etwas kleiner.

Fazit:

In Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) ist die mittlere Verschiebung der Mittelpunkte am größten. Mit steigender Agarose-Konzentration wird die mittlere Verschiebung zunächst kleiner. Bei hohen Agarose-Konzentrationen bleibt die mittlere Verschiebung jedoch konstant und nimmt nicht weiter ab. Mit steigender Agarose-Konzentration wird auch die Streuung der einzelnen Verschiebungen kleiner und damit die einzelnen Schritte der Fortbewegung symmetrischer, d. h. die Fortbewegung der Nematoden wird gleichmäßiger.

Aufnahme-Verfahren III (Verschiebung):

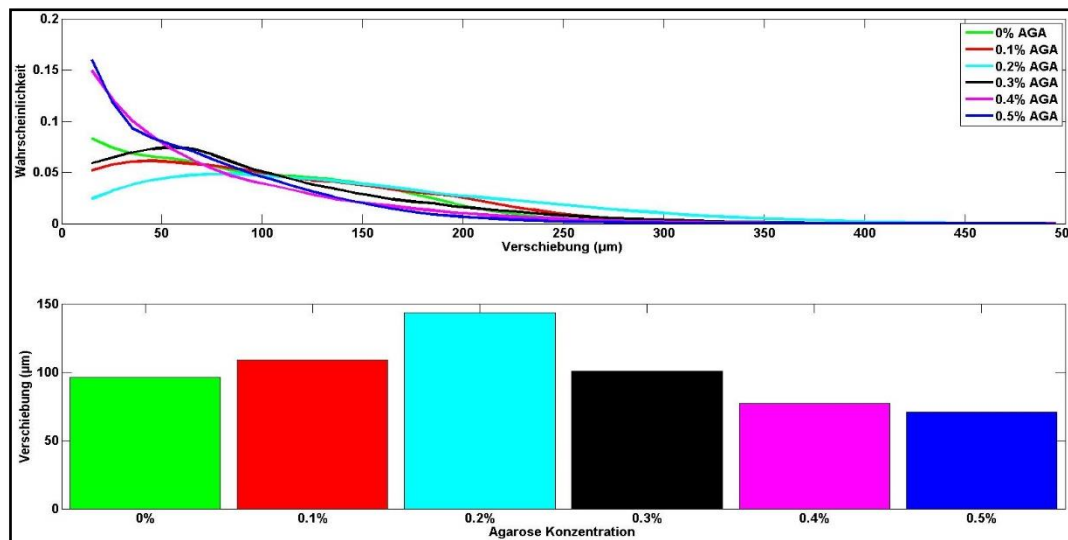


Abbildung 74: (oben) normierte Verteilungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren III).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Verschiebung: [μm]	96	109	143	101	77	71
Standardabweichung: [μm]	62	68	88	71	65	53

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren III)

Beobachtungen:

Die mittlere Verschiebung der Mittelpunkte steigt zunächst mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösungen an. Die maximale mittlere Verschiebung von $143 \mu\text{m}$ besitzen die Nematoden in einer Lösung mit $0,2 \%$ Agarose-Anteil. Wird die Agarose-Konzentration der Lösung über $0,2 \%$ hinaus erhöht, fällt die mittlere Verschiebung kontinuierlich bis zu ihrem Minimalwert von $71 \mu\text{m}$ bei $0,5 \%$ Agarose-Anteil. Für geringe Agarose-Konzentrationen (0% - $0,2 \%$) sind die Verteilungen der Verschiebung etwas breiter, d. h. sie fallen zu großen Verschiebungen hin langsamer ab. Mit zunehmender mittlerer Verschiebung steigt auch die Streuung der Verschiebung an. Nach dem Erreichen ihres Maximalwerts ($88 \mu\text{m}$) bei $0,2 \%$ Agarose-Anteil, fällt auch die Streuung wieder ab. Die kleinste Streuung ergab sich in der Lösung mit $0,5 \%$ Agarose-Konzentration.

Fazit:

Bei einer Aufnahme-Geschwindigkeit von $2,1$ Bildern pro Sekunde besitzen die Nematoden in einer Lösung mit $0,2 \%$ Agarose-Anteil die größte mittlere Verschiebung, d. h. nach etwa einer halben Sekunde haben die Nematoden in einer $0,2 \%$ -igen Agarose-Lösung im Durchschnitt die größte Positionsänderung ihres Mittelpunkts. Hingegen ist bei einer Agarose-Konzentration von $0,5 \%$ die Streuung am geringsten und damit die Bewegung der Nematoden bei dieser Agarose-Konzentration am gleichmäßigsten.

Überblick: (Verschiebung der Mittelpunkte)

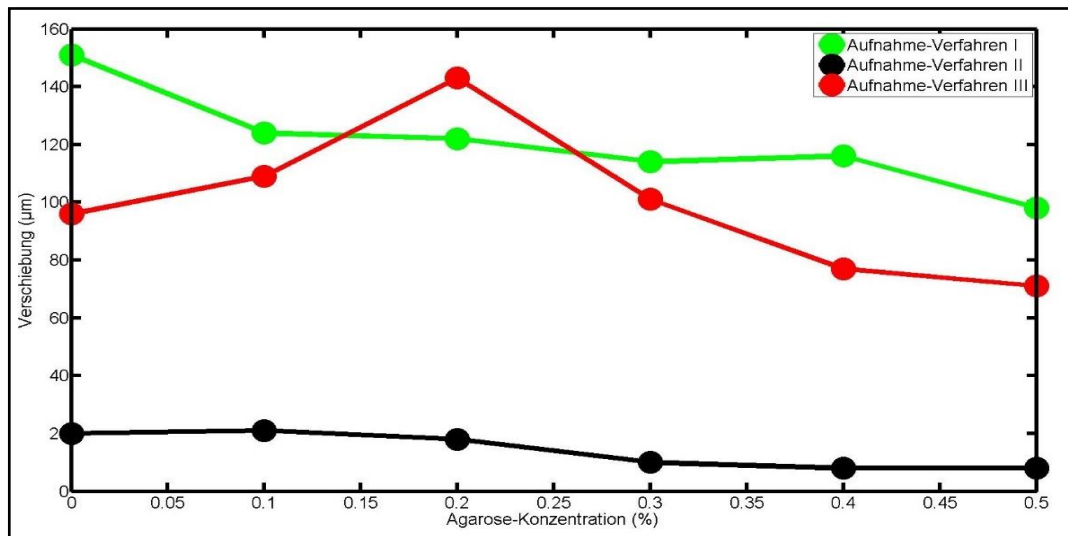


Abbildung 75: Mittelwerte der gemessenen Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen für die verschiedenen Aufnahme-Verfahren.

Agarose-Anteil: [%]:	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Aufnahme-Verfahren I:	151 µm	124 µm	122 µm	114 µm	116 µm	98 µm
Aufnahme-Verfahren II:	20 µm	21 µm	18 µm	10 µm	8 µm	8 µm
Aufnahme-Verfahren III:	96 µm	109 µm	143 µm	101 µm	77 µm	71 µm

Tabelle 8: Die Mittelwerte der gemessenen Verschiebungen der unterschiedlichen Aufnahme-Verfahren.

Mit den Aufnahme-Verfahren I und II konnte gezeigt werden, dass die mittlere Verschiebung auf kleinen Zeitskalen (\ll Periodendauer) mit steigender Agarose-Konzentration der Lösung abnimmt, d. h. bei kurzen Beobachtungszeiten ist die mittlere Positionsänderung der Nematoden in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) am größten. Werden die zeitlichen Abstände zwischen zwei Kameraaufnahmen vergrößert, wandert das Maximum der mittleren Verschiebung zu Lösungen mit höheren Agarose-Konzentrationen hin. Bei einer Aufnahme-Geschwindigkeit von $2,1 \text{ s}^{-1}$ (Aufnahme-Verfahren III) ist das Maximum der Verschiebung bei einer Agarose-Konzentration von 0,2 %. Bei allen Aufnahme-Verfahren nahm die Streuung der Verschiebungen mit zunehmenden Agarose-Anteil in der Lösung ab. Damit wird die Fortbewegung der Nematoden mit steigender Agarose-Konzentration gleichmäßiger.

5.2.2 Anomalie der Bewegung

Aufnahme-Verfahren I (Anomalie der Bewegung)

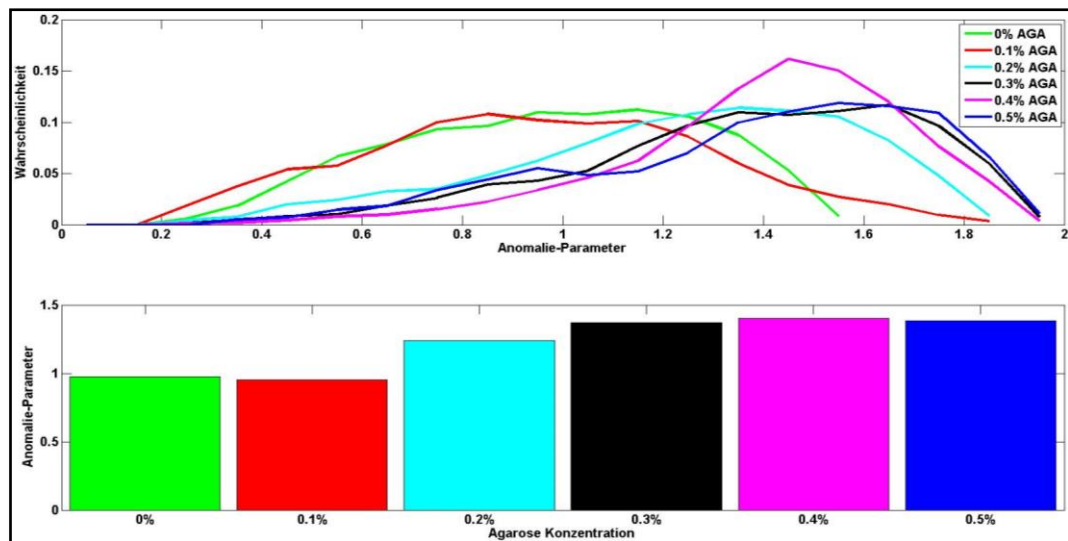


Abbildung 76: (oben) normierte Verteilung der Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren I).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anomalie:	0,98	0,95	1,24	1,37	1,40	1,38
Standardabweichung:	0,29	0,33	0,34	0,33	0,28	0,35

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen des Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren I).

Beobachtung:

In den Lösungen mit den kleinsten Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) ist die Anomalie kleiner als 1. Wird jedoch der Agarose-Anteil der Lösung auf 0,2 % erhöht, erfolgt ein deutlicher Anstieg der Anomalie auf 1,24. In noch höheren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,5 %) ist die Anomalie in etwa konstant bei 1,38. Auch in den einzelnen Verteilungen der Anomalie-Parameter gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Lösungen mit kleinem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) und den restlichen Lösungen. In den Lösungen mit kleinem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) haben die Verteilungen bei den kleineren Anomalien (< 1) deutlich höhere Werte. Die Streuung der Anomalie-Parameter ist wiederum in allen Agarose-Lösungen etwa bei 0,32.

Fazit:

Für Lösungen mit kleiner Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) ist der Anomalie-Parameter der Nematoden-Bewegung ungefähr bei 1. D. h. in diesen Lösungen lässt sich die Bewegung der Nematoden (auf der hier gemessenen Zeit- und Längenskala) mit den Gesetzen der normalen Diffusion gut beschreiben. Mit Erhöhung der Agarose-Konzentration in der Lösung steigt der Anomalie-Parameter zunächst sprunghaft an und bleibt ab einer Agarose-Konzentration von 0,3 % annähernd konstant bei 1,38 (Superdiffusion).

Aufnahme-Verfahren II (Anomalie der Bewegung):

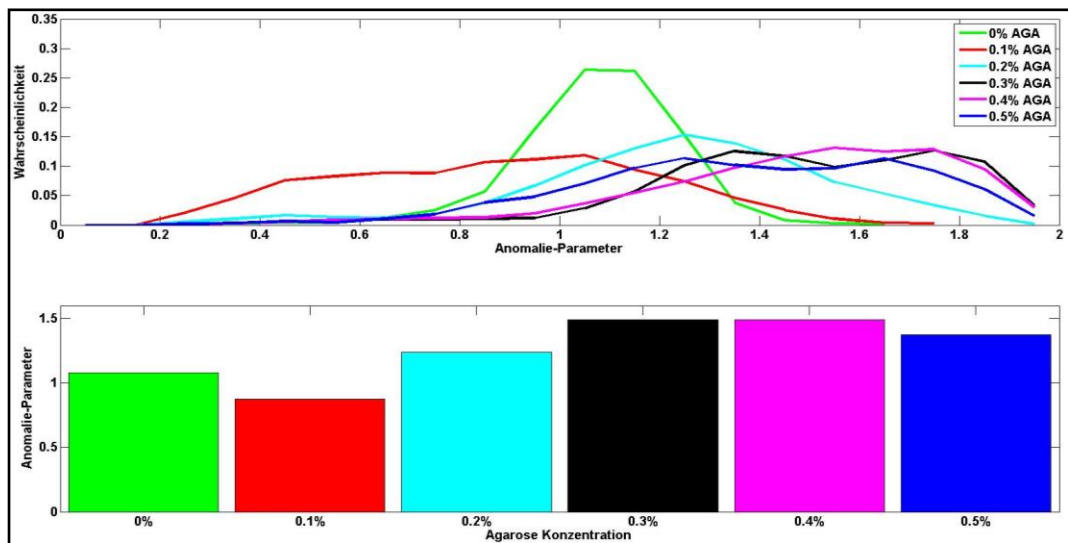


Abbildung 77: (oben) normierte Verteilung der Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen, und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anomalie:	1,07	0,88	1,24	1,49	1,49	1,37
Standardabweichung:	0,14	0,30	0,30	0,31	0,31	0,32

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen des Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtungen:

Für geringe Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) ist der Anomalie-Parameter ungefähr 1. Wird die Agarose-Konzentration der Lösung erhöht, steigt die Anomalie bis zum Erreichen des Maximalwerts bei 0,3 % Agarose sprunghaft an. Für die mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %) bleibt die Anomalie konstant auf diesem hohen Wert (1,49). Erst bei einer Agarose-Konzentration von 0,5 % wird die Anomalie mit 1,37 wieder etwas kleiner. Es gibt deutliche Unterschiede in den Verteilungsfunktionen der Anomalie-Parameter. Die Verteilung in reinem M9 – Puffer ist wesentlich kompakter und hat das mit Abstand größte Maximum. Hingegen beginnt die Verteilung für die 0,1 %-ige Agarose-Lösung schon bei sehr kleinen Anomalie-Werten deutlich zu steigen. Alle anderen Verteilungen (0,2 % - 0,5 %) steigen nur langsam mit zunehmender Anomalie an und fallen nach dem Erreichen ihres Maximums relativ schnell wieder ab. Die Streuung ist in reinem M9-Puffer mit 0,14 am kleinsten. Bei allen anderen Agarose-Lösungen ist die Streuung der Anomalien konstant bei 0,31.

Fazit:

Die Bewegung der Nematoden in Lösungen mit einem geringen Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) lässt sich mit der normalen Diffusion am besten beschreiben. Bei Erhöhung der Agarose-Konzentration steigt die Anomalie der Bewegung sprunghaft auf Werte, die deutlich größer als 1 sind. Damit ändert sich die Bewegung der Nematoden von einer reinen Zufallsbewegung (Anomalie-Parameter ≈ 1) hin zu einer Bewegung mit einem Anteil einer gerichteten Bewegung (Anomalie-Parameter > 1). Der Anomalie-Parameter ist in den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %) am größten und fällt für größere Konzentrationen wieder leicht ab, bleibt aber deutlich größer als 1.

Aufnahme-Verfahren III (Anomalie der Bewegung):

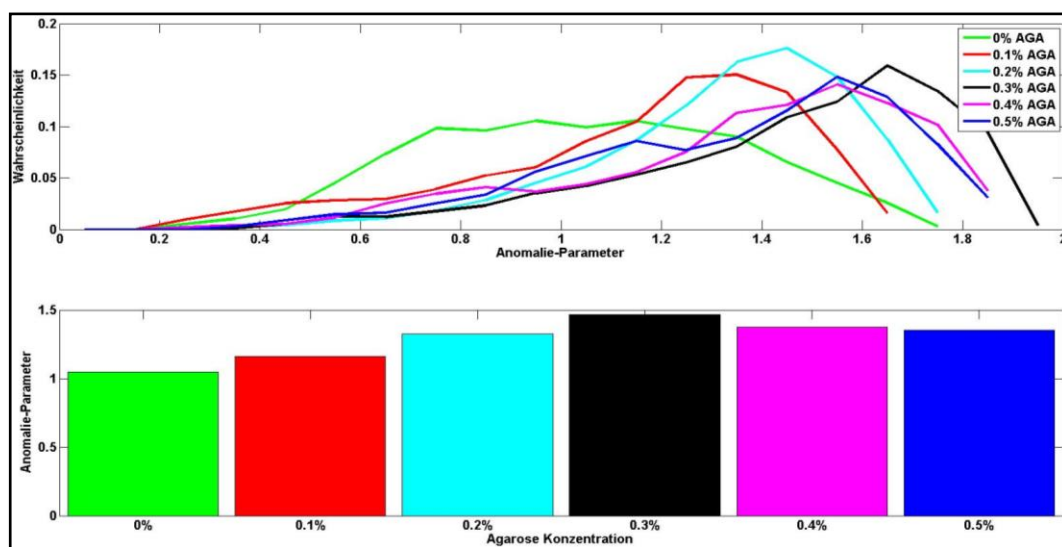


Abbildung 78: (oben) normierte Verteilung der Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren III).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anomalie:	1,05	1,16	1,33	1,46	1,38	1,35
Standardabweichung:	0,31	0,31	0,25	0,32	0,33	0,32

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen des Anomalie-Parameters für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren III).

Beobachtungen:

Die Anomalie steigt nahezu linear mit zunehmender Agarose-Konzentration, bis sie bei einem Agarose-Anteil von 0,3 % ihren Maximalwert von 1,46 erreicht hat. Bei einer weiteren Erhöhung der Agarose-Konzentration sinkt der Anomalie-Parameter wieder leicht ab, bleibt aber deutlich größer als 1. Es gibt markante Unterschiede in den Verteilungsfunktionen für die verschiedenen Agarose-Konzentrationen. Die Verteilungsfunktion der Anomalie-Parameter in reinem M9 – Puffer ist wesentlich breiter als die anderen Verteilungen und hat bei kleineren Anomalien deutlich größere Funktionswerte als alle anderen Verteilungen. Die anderen Verteilungen steigen mit zunehmenden Anomalie-Parameter erst langsam an und fallen nach Erreichen ihres Maximums relativ schnell wieder ab. Obwohl sich der Mittelwert des Anomalie-Parameters mit Erhöhung des Agarose-Anteils in der Lösung ändert, bleibt die Streuung des Anomalie-Parameters für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen nahezu konstant bei 0,31.

Fazit:

Auf diesen großen Zeit- und Längenskalen ist der Anomalie-Parameter in allen Agarose-Konzentrationen immer größer als 1. Damit hat die Bewegung der Nematoden auf dieser Längenskala auch immer einen Anteil einer gerichteten Bewegung. In reinem M9-Puffer ist dieser Anteil jedoch minimal. Mit zunehmender Agarose-Konzentration steigt dieser Anteil und erreicht in den Lösungen mit den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %) sein Maximum. Bei noch höheren Agarose-Konzentrationen sinkt die Anomalie wieder leicht ab, der Anomalie-Parameter bleibt aber deutlich größer als 1.

Überblick: (Anomalie der Bewegung)

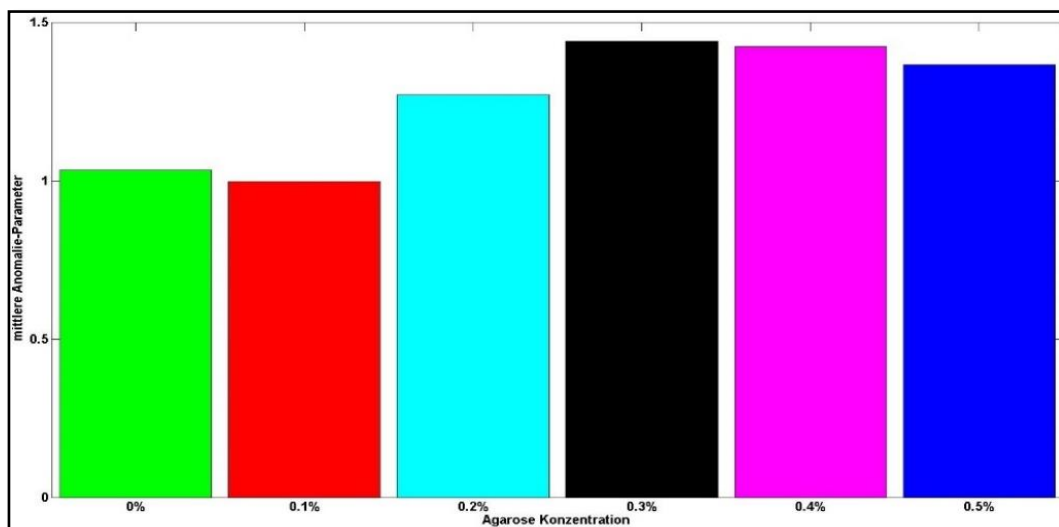


Abbildung 79: Der über die verschiedenen Aufnahme-Verfahren gemittelte Anomalie-Parameter für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Aufnahme-Verfahren I: (12,2 s)	0,98	0,95	1,24	1,37	1,40	1,38
Aufnahme-Verfahren II: (5,5 s)	1,07	0,88	1,24	1,49	1,49	1,37
Aufnahme-Verfahren III: (77,1 s)	1,05	1,16	1,33	1,46	1,38	1,35
Mittelwert:	1,03	1,00	1,27	1,44	1,43	1,36

Tabelle 12: Der gemittelte Anomalie-Parameter für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Bei allen Aufnahme-Verfahren stieg der Anomalie-Parameter mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung. Die größten Anomalie-Parameter hatte die Bewegung der Nematoden in den Lösungen, die Agarose-Konzentrationen zwischen 0,3 % und 0,4 % haben (optimaler Bereich). Bei einem Agarose-Anteil der Lösung von 0,5 % nahm die Anomalie wieder leicht ab, blieb aber deutlich größer als 1 (Superdiffusion). Mit den Aufnahme-Verfahren I und II konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Nematoden-Bewegung in Lösungen mit 0 % und 0,1 % Agarose-Anteil für kurze Zeit rein diffusiv ist, da die Anomalie-Parameter in diesen Lösungen in etwa 1 sind. Auch bei längeren Beobachtungszeiten blieb in reinem M9-Puffer die Anomalie nahe 1 (Diffusion). Hingegen stieg in der Lösung mit 0,1 % Agarose-Anteil bei längeren Beobachtungszeiten der Anomalie-Parameter auf einen Wert von 1,16 an. Ab einer Agarose-Konzentration von 0,2 % war der Anomalie-Parameter in allen Lösungen und bei allen Aufnahme-Verfahren deutlich größer als 1. Damit ist die Bewegung der Nematoden in diesen Lösungen auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen superdiffusiv.

5.2.3 Mean first passage time

Aufnahme-Verfahren I (mean first passage time):

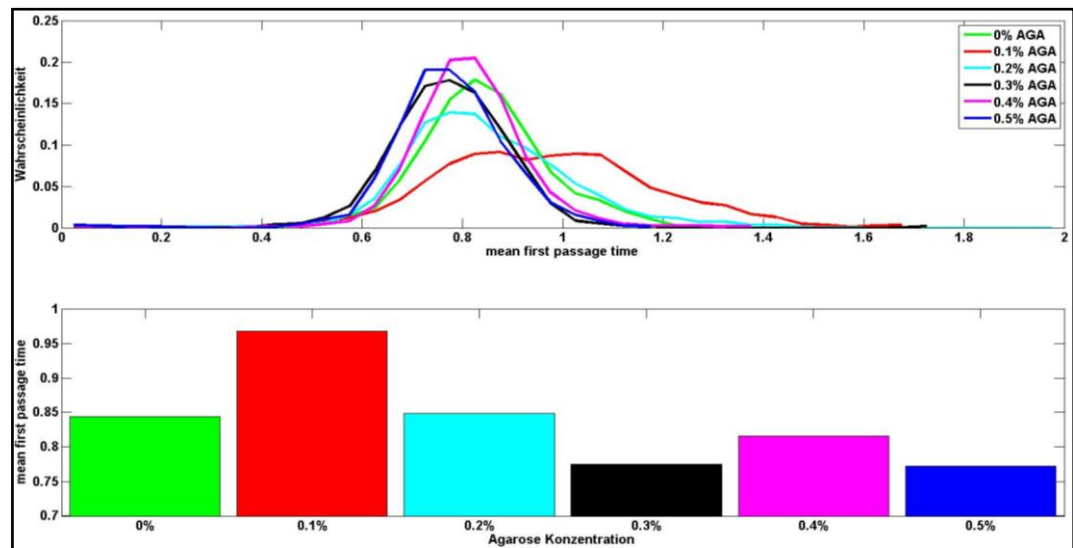


Abbildung 80: (oben) normierte Verteilung der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren I).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Mean first passage time:	0,84	0,97	0,85	0,78	0,82	0,77
Standardabweichung:	0,12	0,21	0,17	0,12	0,11	0,12

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren I).

Beobachtungen:

Wird die Agarose-Konzentration in der Lösung von 0 % auf 0,1 % erhöht, steigt die 'mean first passage time' sprunghaft von 0,84 auf 0,97 an. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 0,2 % fällt sie jedoch genauso stark wieder ab. Für die größeren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,5 %) ist die 'mean first passage time' (nahezu) konstant bei 0,79. In der Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil ist sie mit 0,82 etwas größer als in den Lösungen mit 0,3 % und 0,5 % Agarose-Anteil, aber sie ist immer noch kleiner als in allen Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,2 %). Bei einem Agarose-Anteil von 0,1 % ist nicht nur die größte 'mean first passage time' festzustellen, sondern auch die Streuung der einzelnen Werte ist mit 0,21 maximal. Bei einem Agarose-Anteil der Lösung von 0,2 % ist die Streuung der Werte mit 0,17 immer noch deutlich größer als in den anderen Lösungen. Dies wird bereits an den abweichenden Formen der beiden Verteilungen sichtbar (besonders bei 0,1 % Agarose). In allen anderen Agarose-Lösungen (0 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %) ist die Streuung konstant bei 0,12.

Fazit:

In den Lösungen mit größeren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,5 %) ist die 'mean first passage time' (nahezu) konstant und kleiner als in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil. Damit benötigen die Nematoden in Lösungen mit höherem Agarose-Anteil im Mittel eine kürzere Zeit, um eine bestimmte Distanz zurückzulegen. Auffällig sind die großen Schwankungen (und die große Streuung) der 'mean first passage time' in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil.

Aufnahme-Verfahren II (mean first passage time):

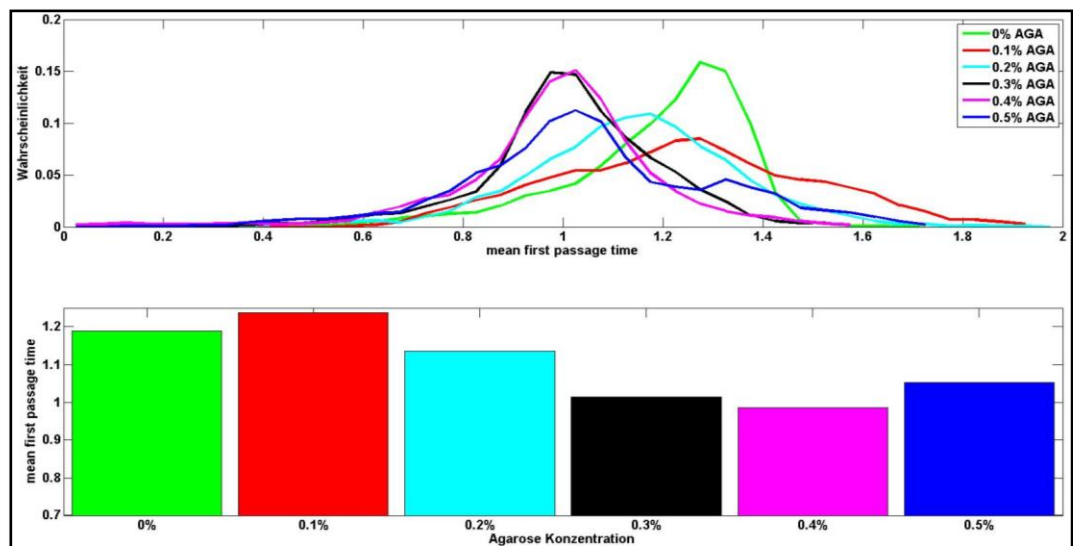


Abbildung 81: (oben) normierte Verteilung der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Mean first passage time:	1,19	1,24	1,14	1,01	0,99	1,05
Standardabweichung:	0,18	0,27	0,21	0,18	0,20	0,25

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtung:

Bei geringen Konzentrationen (0 % - 0,1 %) bleibt die 'mean first passage time' beinahe konstant bei 1,21. Wird die Agarose-Konzentration der Lösung von 0,1 % auf 0,2 % erhöht, fällt die 'mean first passage time' auf 1,14 ab. Bei nochmaliger Erhöhung des Agarose-Anteils auf 0,3 % fällt die 'mean first passage time' erneut deutlich ab. Ab einer Agarose-Konzentration von 0,3 % bleibt sie jedoch auf einem konstanten Wert von 1,02 und sinkt mit steigender Agarose-Konzentration nicht weiter ab. Die Verteilungsfunktion für die 0,1 %-ige Agarose-Lösung ist etwas breiter als die Verteilungen der anderen Lösungen. Daher ist die Streuung der einzelnen Werte auch bei dieser Agarose-Konzentration am größten.

Fazit:

In Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) benötigen die Nematoden im Durchschnitt die längste Zeit, um eine bestimmte Distanz zurückzulegen. In den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,1 % - 0,3%) fällt die 'mean first passage time' abrupt mit zunehmender Agarose-Konzentration ab. Für noch höhere Konzentrationen bleibt sie konstant auf einem niedrigen Niveau (bzw. steigt für 0,5 % Agarose wieder leicht an). Damit können sich die Nematoden in Lösungen mit höherem Agarose-Anteil im Durchschnitt schneller von einem beliebigen Punkt auf ihrer Bahnkurve entfernen.

Aufnahme-Verfahren III (mean first passage time):

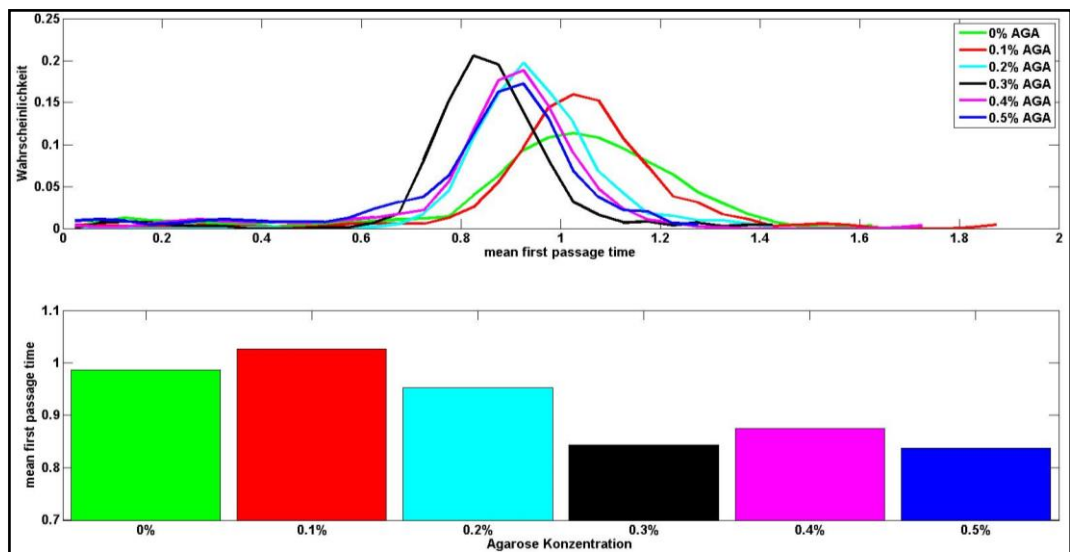


Abbildung 82: (oben) normierte Verteilung der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren III).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Mean first passage time:	0,99	1,03	0,95	0,84	0,87	0,84
Standardabweichung:	0,27	0,21	0,12	0,17	0,19	0,22

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren III).

Beobachtungen:

Mit zunehmender Agarose-Konzentration steigt die 'mean first passage time' von 0,99 in reinem M9-Puffer auf ihren Maximalwert von 1,03 in einer 0,1 %-igen Agarose-Lösung an. Wird die Agarose-Konzentration der Lösung auf 0,2 % erhöht, fällt die 'mean first passage time' wieder unter den Wert von 1. Ab einer Agarose-Konzentration von 0,3 % bleibt sie nahezu konstant bei 0,85. Die einzelnen Verteilungen haben in etwa die gleiche kompakte Form und besitzen ein deutliches Maximum in der Nähe ihres Mittelwerts. Für kleinere Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) sind die Verteilungen etwas breiter. Die Streuung reicht von 0,12 in einer Lösung mit 0,2 % Agarose-Anteil bis hin zu 0,27 in reinem M9-Puffer.

Fazit:

In den Lösungen mit niedrigen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,2 %) ist die 'mean first passage time' deutlich größer als in den Lösungen mit hohen Agarose-Konzentrationen. Damit erreichen die Nematoden in einer Lösung mit hohem Agarose-Anteil schneller einen bestimmten Abstand von einem beliebigen Punkt auf ihrer Bahnkurve. Bei höheren Agarose-Konzentrationen ist die 'mean first passage time' nahezu unabhängig von dem exakten Agarose-Anteil der Lösung. Bei geringen Agarose-Konzentrationen hingegen gibt es deutliche Schwankungen der 'mean first passage time' zwischen den einzelnen Agarose-Lösungen.

Überblick: (mean first passage time)

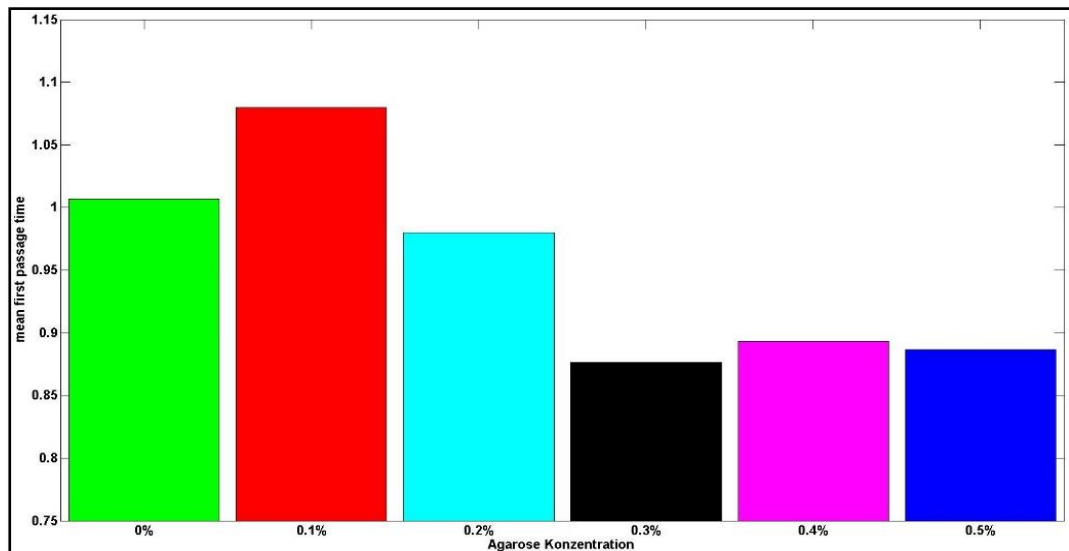


Abbildung 83: Die über die verschiedenen Aufnahme-Verfahren gemittelte 'mean first passage time' für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Aufnahme-Verfahren I: (12,2 s)	0,84	0,97	0,85	0,78	0,82	0,77
Aufnahme-Verfahren II: (5,5 s)	1,19	1,24	1,14	1,01	0,99	1,05
Aufnahme-Verfahren III: (77,1 s)	0,99	1,03	0,95	0,84	0,87	0,84
Mittelwert:	1,01	1,08	0,98	0,88	0,89	0,89

Tabelle 16: Die gemittelte 'mean first passage time' für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Mit der zusätzlichen Betrachtung der 'mean first passage time' konnten die Ergebnisse, die bei der Auswertung des Anomalie-Parameters gemacht wurden, nochmals bestätigt werden. Bei allen Aufnahme-Verfahren war die 'mean first passage time' der Nematoden-Bewegung in den Lösungen, die einen Agarose-Anteil zwischen 0,3 % und 0,5 % haben, deutlich kleiner. Der kleinste Wert wurde in einer Lösung mit 0,3 % Agarose-Anteil gemessen. Wegen der kleineren 'mean first passage time' benötigen die Nematoden in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil im Durchschnitt weniger Zeit, um einen bestimmten Abstand von einem beliebigen Punkt auf ihrer Bahnkurve das erste Mal zu erreichen. Damit ist der Anteil der gerichteten Bewegung an der Gesamtbewegung der Nematoden höher, d. h. die Anomalie der Bewegung ist größer (Ergebnis der Auswertung des Anomalie-Parameters). Bei den Messungen mit den unterschiedlichen Aufnahme-Verfahren hat sich auch gezeigt, dass die 'mean first passage time' in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) nahezu unabhängig von der genauen Agarose-Konzentration ist. Steigt die Agarose-Konzentration der Lösung über 0,3 %, ändert sich die 'mean first passage time' der Nematoden-Bewegung nur noch minimal. Bewegt sich hingegen der Nematode in einer Lösung mit geringem Agarose-Anteil, kann es bereits bei kleinen Änderungen der Agarose-Konzentration zu deutlichen Änderungen der 'mean first passage time' kommen. Dieser Effekt konnte auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen der verschiedenen Aufnahme-Verfahren beobachtet werden.

5.2.4 Mittlere Wegeffizienz

Aufnahme-Verfahren I (mittlere Wegeffizienz):

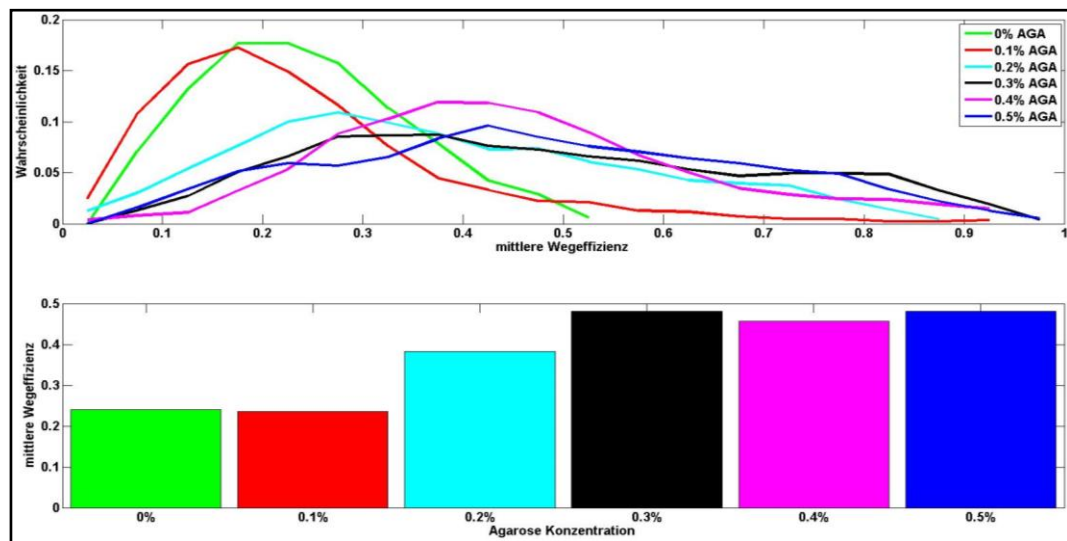


Abbildung 84: (oben) normierte Verteilungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren I).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Wegeffizienz:	0,24	0,24	0,38	0,48	0,46	0,48
Standardabweichung:	0,10	0,15	0,19	0,22	0,18	0,21

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren I).

Beobachtungen:

In den Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) ist die mittlere Wegeffizienz konstant auf ihrem Minimalwert von 0,24. Wird die Agarose-Konzentration der Lösung auf 0,2 % erhöht, macht die mittlere Wegeffizienz einen Sprung auf 0,38. Bei einer nochmaligen Erhöhung der Agarose-Konzentration auf 0,3 % erfolgt ein weiterer Sprung auf ihren Maximalwert von 0,48. Für alle Lösungen mit hohem Anteil an Agarose (0,3 % - 0,5 %) bleibt sie (nahezu) konstant auf diesem Maximalwert. Für die kleinen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) sind die Verteilungsfunktionen fast ausschließlich auf Werte zwischen 0 und 0,5 beschränkt. In reinem M9-Puffer wird die mittlere Wegeffizienz der Nematoden nie größer als 0,53. In Lösungen mit höherem Agarose-Anteil (0,2 % - 0,5 %) hingegen kann die mittlere Wegeffizienz einer Tracking-Sequenz (beinahe) jeden Wert zwischen 0 und 1 annehmen. Daher ist auch die Streuung der Werte bei höheren Agarose-Konzentrationen etwas größer.

Fazit:

In Lösungen mit geringen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) ist die Bewegung der Nematoden nicht besonders effizient, da sie große Umwege zurücklegen, um einen bestimmten Abstand von ihrem Startpunkt zu erreichen. Die mittlere Wegeffizienz steigt mit zunehmender Agarose-Konzentration zunächst an und bleibt ab 0,3 % Agarose-Anteil konstant auf einem hohen Wert. Damit ist die Fortbewegung der Nematoden in Agarose-Konzentrationen ab 0,3 % viel effizienter, da die Nematoden auch größere Strecken ohne Umwege zurücklegen können.

Aufnahme-Verfahren II (mittlere Wegeffizienz):

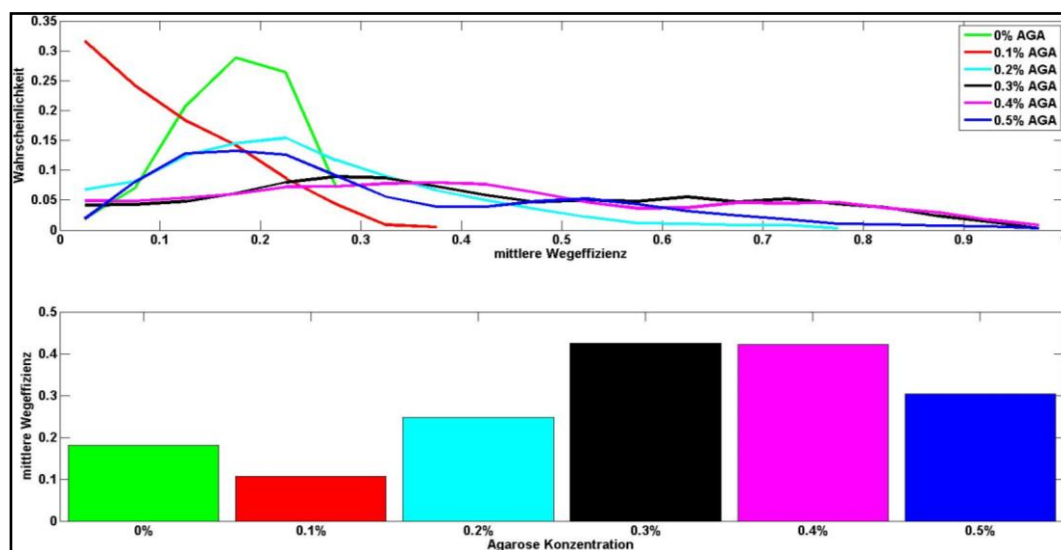


Abbildung 85: (oben) normierte Verteilungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Wegeffizienz:	0,18	0,11	0,25	0,43	0,42	0,30
Standardabweichung:	0,05	0,07	0,15	0,24	0,25	0,21

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtungen:

Für geringe Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) ist die mittlere Wegeffizienz unterhalb von 0,20. Erst bei einer Agarose-Konzentration von 0,2 % erreicht die mittlere Wegeffizienz einen Wert von 0,25. Bei einer weiteren Erhöhung der Agarose-Konzentration auf 0,3 % steigt die mittlere Wegeffizienz nochmals deutlich auf 0,43 an. Diesen Maximalwert erreichen die Nematoden nur in den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %). Bei einer noch höheren Agarose-Konzentration (0,5 %) fällt die mittlere Wegeffizienz wieder ab, bleibt aber mit 0,30 deutlich höher als in den geringen Agarose-Konzentrationen. Die Verteilungsfunktionen für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen unterscheiden sich deutlich voneinander. In Lösungen mit kleinem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) erreicht die mittlere Wegeffizienz keinen Wert größer als 0,40. Hingegen kann die mittlere Wegeffizienz in Lösungen mit höherem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) nahezu jeden Wert zwischen 0 und 1 annehmen. Daher ist die Streuung in den Lösungen mit höherem Agarose-Anteil deutlich größer.

Fazit:

In Lösungen mit einem mittleren Agarose-Anteil (0,3 % - 0,4 %) ist die Bewegung der Nematoden am effizientesten, d. h. die mittlere Wegeffizienz ist dort am größten. In Lösungen mit geringen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,1 %) konnte keine Tracking-Sequenz aufgenommen werden, deren mittlere Wegeffizienz größer als 0,40 ist. Damit können sich die Nematoden in diesen Lösungen nicht auf geradlinigen Bahnen fortbewegen und machen deshalb große Umwege, um bestimmte Entfernungen zurückzulegen.

Aufnahme-Verfahren III (mittlere Wegeffizienz):

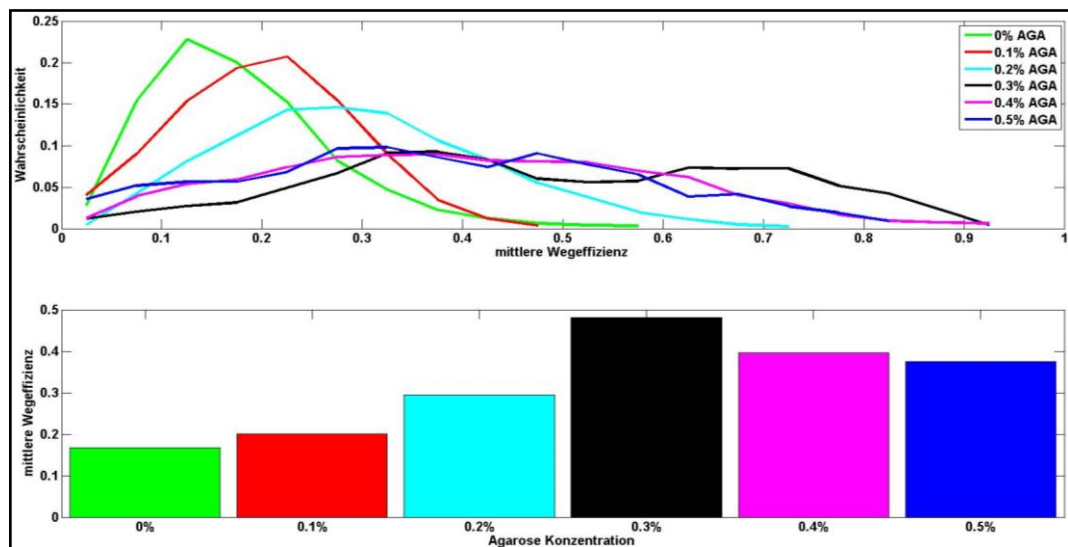


Abbildung 86: (oben) normierte Verteilungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren III).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Wegeffizienz:	0,17	0,20	0,30	0,48	0,40	0,38
Standardabweichung:	0,09	0,08	0,13	0,21	0,19	0,19

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren III).

Beobachtungen:

Die mittlere Wegeffizienz steigt mit zunehmendem Agarose-Anteil der Lösung, bis sie bei einer Agarose-Konzentration von 0,3 % ihren Maximalwert von 0,48 erreicht hat. Wird der Agarose-Anteil der Lösung über 0,3 % erhöht, fällt die mittlere Wegeffizienz zunächst auf 0,40 (0,4 % Agarose) und weiter auf 0,38 (0,5 % Agarose) ab. Trotz dieses zweimaligen Abfalls bleibt die mittlere Wegeffizienz bei höheren Agarose-Konzentrationen auf deutlich größeren Werten als bei geringeren Agarose-Konzentrationen. Die Verteilungsfunktionen für die verschiedenen Agarose-Lösungen unterscheiden sich recht deutlich voneinander. In Lösungen mit kleinem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) erreicht die mittlere Wegeffizienz keine Werte größer als 0,6. Dagegen kann in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) die mittlere Wegeffizienz einer Tracking-Sequenz wesentlich größere Werte annehmen. Daher sind auch die Streuungen in den Lösungen mit höherem Agarose-Anteil größer.

Fazit:

In den Lösungen mit einem hohen Anteil an Agarose (0,3 % - 0,5 %) können sich die Nematoden viel effizienter fortbewegen. D. h. sie machen bei ihrer Fortbewegung die kleinsten Umwege, um von einem Punkt zum anderen zu gelangen. In Lösungen mit geringem Agarose-Anteil hingegen legen die Nematoden keine längeren Strecken geradlinig zurück, sondern machen große Umwege bei ihrer Fortbewegung.

Überblick: (mittlere Wegeffizienz)

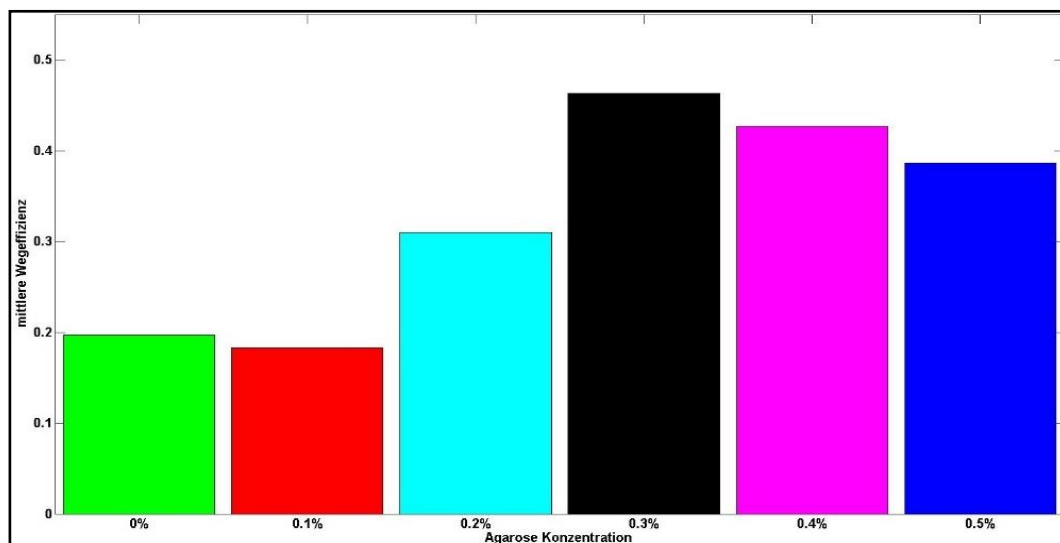


Abbildung 87: Die über die verschiedenen Aufnahme-Verfahren gemittelte mittlere Wegeffizienz für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Aufnahme-Verfahren I: (12,2 s)	0,24	0,24	0,38	0,48	0,46	0,48
Aufnahme-Verfahren II: (5,5 s)	0,18	0,11	0,25	0,43	0,42	0,30
Aufnahme-Verfahren III: (77,1 s)	0,17	0,20	0,30	0,48	0,40	0,38
Mittelwert:	0,20	0,19	0,31	0,46	0,43	0,38

Tabelle 20: Die gemittelte mittlere Wegeffizienz für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Durch die Auswertung der (selbst definierten) mittleren Wegeffizienz konnten weitere Unterschiede bei der Bewegung der Nematoden in den verschiedenen Agarose-Lösungen aufgezeigt werden. Die Bewegung der Nematoden hat in Lösungen mit kleinen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,2 %) eine wesentlich geringere mittlere Wegeffizienz. Dies hat sich auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen der unterschiedlichen Aufnahme-Verfahren gezeigt. Nicht nur der Durchschnitt der mittleren Wegeffizienz ist geringer, sondern auch die Maximalwerte der mittleren Wegeffizienz unterscheiden sich deutlich voneinander. In reinem M9-Puffer konnte mit keinem Aufnahme-Verfahren eine Tracking-Sequenz gemessen werden, bei der die Bewegung der Nematoden eine größere mittlere Wegeffizienz als 0,63 hatte. Für die Lösung mit 0,1 % Agarose-Anteil konnten nur auf sehr kurzen Zeitskalen Werte der mittleren Wegeffizienz größer als 0,47 gemessen werden. Damit steht fest, dass die Nematoden in Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration keine (längeren) Strecken ohne größere Umwege zurücklegen können. Bewegen sich hingegen die Nematoden in Lösungen mit höheren Agarose-Konzentrationen, so kann ihre mittlere Wegeffizienz nahezu jeden Wert annehmen. Sogar auf längeren Strecken kann die mittlere Wegeffizienz noch Werte größer als 0,8 erreichen. D. h. die Nematoden können auch längere Strecken auf direktem Weg (geradlinig) zurücklegen.

5.3 Analyse der Körperform

*Ausgewertet werden die im vorherigen Kapitel definierten physikalischen Größen zur Beschreibung der Körperform (Kap. 4.3). Ausgewertet werden nur die Messdaten des Aufnahme-Verfahren II.

Mittlere lokale Krümmung (Aufnahme-Verfahren II):

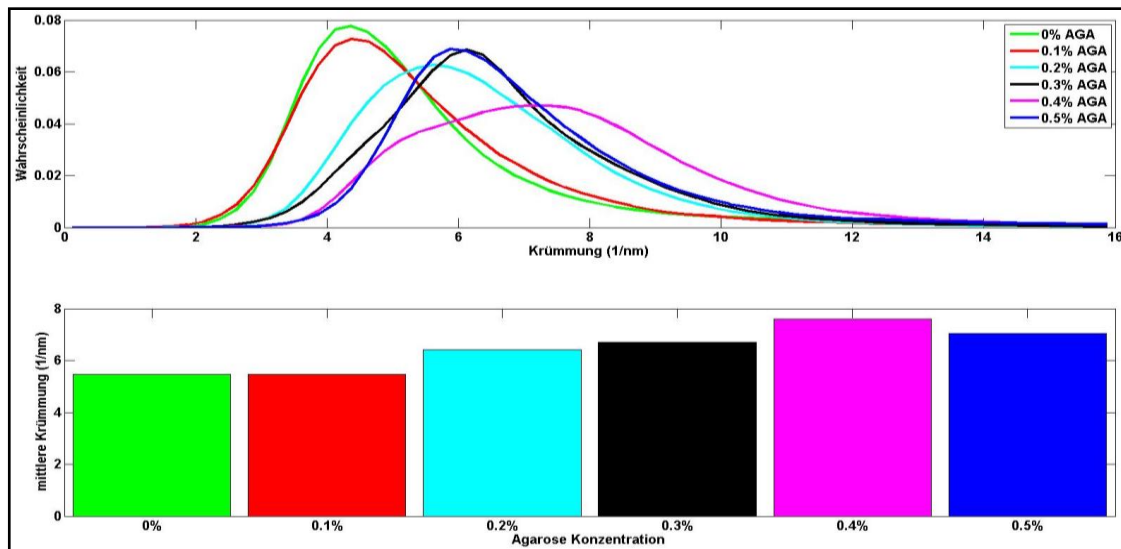


Abbildung 88: (oben) normierte Verteilungen der mittleren lokalen Krümmung in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Krümmung: [1/nm]:	5,48	5,46	6,42	6,70	7,61	7,04
Standardabweichung: [1/nm]	2,17	2,00	1,86	1,90	2,18	2,02

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren lokalen Krümmungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtungen:

In Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) ist die mittlere lokale Krümmung der Nematoden konstant bei $5,47 \text{ nm}^{-1}$. Wird der Agarose-Anteil in der Lösung erhöht, steigt auch die mittlere lokale Krümmung. Die größte lokale Krümmung von $7,61 \text{ nm}^{-1}$ besitzen die Nematoden in einer Lösung mit 0,4 % Agarose. In noch höheren Agarose-Konzentrationen (0,5 %) fällt die mittlere Krümmung wieder ab, bleibt aber auf einem hohen Wert ($7,04 \text{ nm}^{-1}$). Da die Verteilungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen alle eine vergleichbare Form besitzen und ein deutliches Maximum haben, kann die Verschiebung der Maxima bei steigendem Agarose-Anteil der Lösung deutlich erkannt werden. Die Streuung ist in allen Agarose-Lösungen in etwa bei $2,0 \text{ nm}^{-1}$.

Fazit:

Mit zunehmender Agarose-Konzentration steigt die mittlere Krümmung der Nematoden bei ihrer Fortbewegung. In einer Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil ist die mittlere Krümmung der Nematoden maximal. Bei einer weiteren Erhöhung der Agarose-Konzentration fällt die mittlere Krümmung der Nematoden wieder leicht ab.

Mittlere Periodendauer (Aufnahme-Verfahren II):

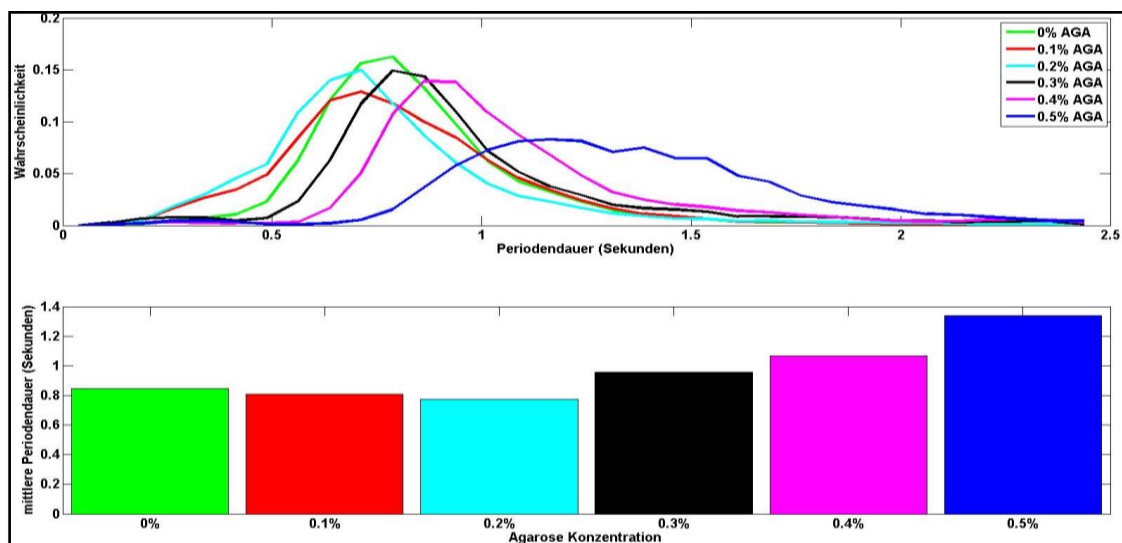


Abbildung 89: (oben) normierte Verteilungen der Periodendauern in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Periodendauer: [s]:	0,85	0,81	0,77	0,96	1,07	1,34
Standardabweichung: [s]	0,25	0,29	0,31	0,35	0,34	0,37

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der Periodendauern in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtungen:

In kleinen Agarose-Konzentrationen (0 % - 0,2 %) ist die mittlere Periodendauer (nahezu) konstant bei 0,81 Sekunden. Erst ab einem Agarose-Anteil von 0,2 % steigt die mittlere Periodendauer bei jeder Erhöhung der Agarose-Konzentration weiter an. Dementsprechend ergab sich der größte Wert für die mittlere Periodendauer (1,34 Sekunden) bei einer Agarose-Konzentration von 0,5 %. Die größte Zunahme der mittleren Periodendauer von 0,27 Sekunden wurde bei einer Erhöhung der Agarose-Konzentration von 0,4 % auf 0,5 % beobachtet. Mit zunehmender mittlerer Periodendauer steigt auch die Streuung der einzelnen Periodendauern. Dies kann bereits an der Form der Verteilungsfunktionen gesehen werden. Die Verteilungsfunktion der Lösung mit 0,5 % Agarose-Anteil ist viel breiter als alle anderen Verteilungen. Daher ist auch die Streuung in einer 0,5 %-igen Agarose-Lösung am größten.

Fazit:

In Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration ist die mittlere Periodendauer der Bewegung nahezu konstant bei 0,81 Sekunden. In Lösungen mit größerem Agarose-Anteil hingegen steigt die mittlere Periodendauer mit zunehmender Agarose-Konzentration kontinuierlich an, d. h. die Nematoden benötigen in Lösungen mit höherem Agarose-Anteil länger für einen vollständigen Bewegungszyklus.

Maximale Auslenkung (Aufnahme-Verfahren II):

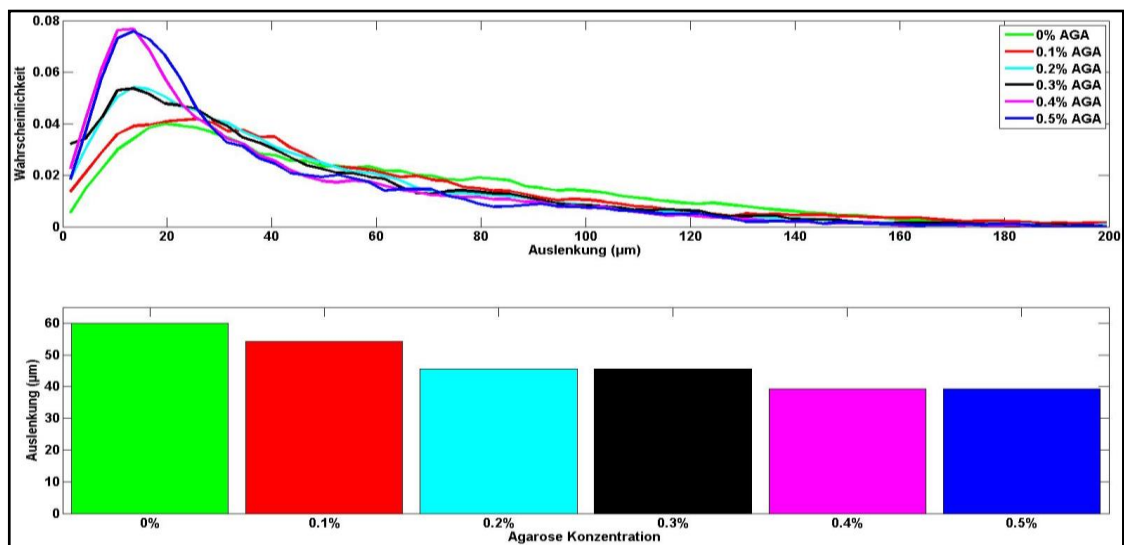


Abbildung 90: (oben) normierte Verteilungen der maximalen Auslenkung in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und **(unten)** die dazugehörigen Mittelwerte (Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
max. Auslenkung: [μm]:	60	54	46	46	39	39
Standardabweichung: [μm]	42	42	37	38	35	35

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen der maximalen Auslenkung für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen (Aufnahme-Verfahren II).

Beobachtungen:

In reinem M9-Puffer ist die mittlere maximale Auslenkung mit $60 \mu\text{m}$ am größten. Mit steigender Agarose-Konzentration nimmt sie kontinuierlich ab. Der Minimalwert von $39 \mu\text{m}$ ist bei einem Agarose-Anteil von $0,4 \%$ erreicht. Bei noch größeren Agarose-Konzentrationen ($0,5 \%$) bleibt die mittlere maximale Auslenkung auf diesem Wert stehen. Die Verteilungsfunktionen für die unterschiedlichen Agarose-Konzentrationen haben alle in etwa die gleiche Form und besitzen ein deutliches Maximum. Mit zunehmenden Agarose-Anteil in der Lösung steigt jedoch die Höhe des Maximums und die Verteilungen werden ein wenig kompakter, d. h. sie fallen zu größeren Werten hin etwas schneller ab. Die Streuung der einzelnen Werte hingegen sinkt mit zunehmender Agarose-Konzentration.

Fazit:

In Lösungen mit geringen Agarose-Konzentrationen pendeln die Mittelpunkte auf der Bahnkurve während einer Periode stärker, d. h. der zurückgelegte Weg zwischen dem Anfangs- und Endpunkt einer Periode ist länger. Dadurch müssen die Nematoden einen größeren Weg zurücklegen, um eine bestimmte Distanz zu überwinden. Mit zunehmender Agarose-Konzentration nimmt die mittlere maximale Auslenkung der Mittelpunkte ab. Die Nematoden laufen somit auf direkterem Weg zwischen dem Anfangs- und Endpunkt einer Periode. Da zusätzlich die Streuung mit zunehmenden Agarose-Anteil abnimmt, werden die maximalen Auslenkungen pro Periode gleichmäßiger, d. h. die wird Bewegung symmetrischer.

Überblick: (Änderung der Körperform)

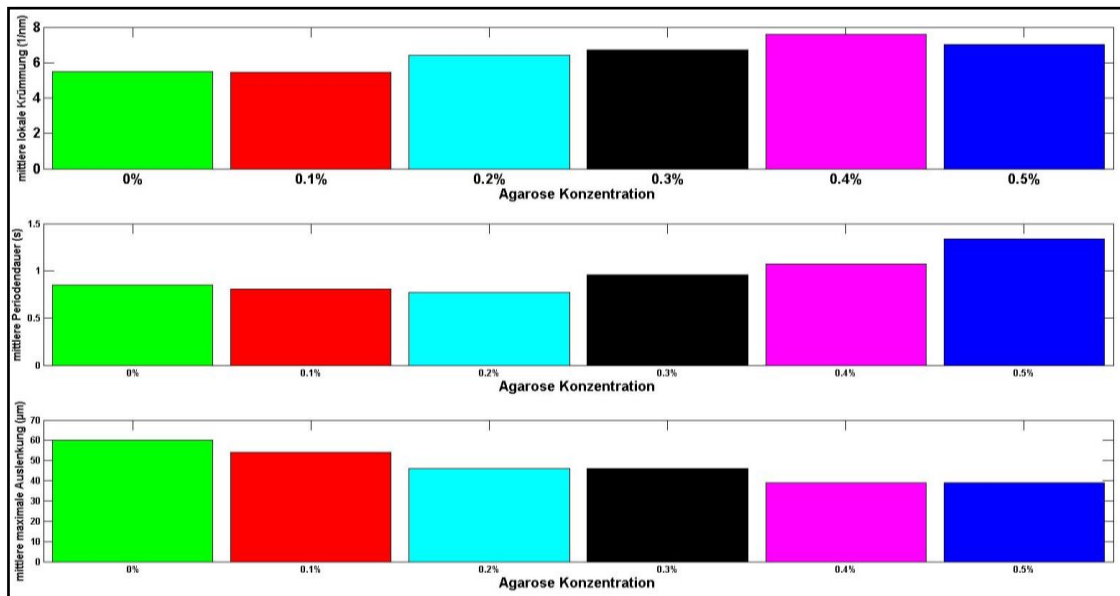


Abbildung 91: Die (**oben**) mittlere lokale Krümmung, (**Mitte**) mittlere Periodendauer und (**unten**) mittlere maximale Auslenkung in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen (gemessen ausschließlich mit dem Aufnahme-Verfahren II).

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Mittlere Krümmung: [1/nm]	5,48	5,46	6,42	6,70	7,61	7,04
Mittlere Periodendauer: [s]	0,85	0,81	0,77	0,96	1,07	1,34
Max. Auslenkung: [µm]	42	42	37	38	35	35

Tabelle 24: Die Mittelwerte für die Analyse der Körperform (Aufnahme-Verfahren II).

Bei der Analyse der Körperform der Nematoden konnte festgestellt werden, dass die mittlere Periodendauer der Bewegung für geringe Agarose-Konzentrationen zwischen 0 % und 0,2 % nahezu konstant bei 0,81 Sekunden ist. In Lösungen mit höherer Agarose-Konzentration steigt die mittlere Periodendauer mit zunehmendem Agarose-Anteil kontinuierlich an. Damit benötigen die Nematoden mit steigendem Agarose-Anteil der Lösung immer länger, um einen vollständigen Bewegungszyklus auszuführen. Bei einer Agarose-Konzentration von 0,5 % wurde die größte mittlere Periodendauer (1,34 Sekunden) gemessen. Die mittlere lokale Krümmung der Nematoden steigt ebenfalls mit zunehmendem Agarose-Anteil der Lösung. In einer Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil haben die Nematoden ihre maximale mittlere Krümmung erreicht. Im Gegensatz zur Periodendauer fällt jedoch die mittlere Krümmung bei einer weiteren Erhöhung der Agarose-Konzentration auf 0,5 % wieder ab. Die mittlere maximale Auslenkung der Mittelpunkte während einer Periode nimmt mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung ab. Der Minimalwert ist bei einer Agarose-Konzentration von 0,4 % erreicht, weiter fällt sie auch in noch höheren Agarose-Konzentrationen nicht ab. Auch die Streuung der max. Auslenkungen nimmt mit zunehmender Agarose-Konzentration ab. Dadurch wird die Bewegung der Nematoden mit steigender Agarose-Konzentration direkter (kleinere Auslenkungen) und gleichmäßiger (kleinere Streuung).

Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse:

Aus den Auswertungen der verschiedenen Aufnahme-Verfahren geht hervor, dass auf kurzen Zeitskalen (\ll Periodendauer) die Nematoden in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil ihre Position am schnellsten ändern können, da die mittlere Verschiebung mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung abnimmt. Jedoch sind diese einzelnen Positionsänderungen in den Lösungen mit geringem Agarose-Anteil nicht besonders gut koordiniert, sodass die Fortbewegung der Nematoden in diesen Lösungen nicht besonders effektiv ist. Dies wurde bei der Betrachtung der Anomalie-Parameter für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen deutlich. In reinem M9-Puffer ist der Anomalie-Parameter der Nematoden-Bewegung auf allen gemessenen Zeitskalen nahe 1 (Diffusion) und stieg auch bei längerer Beobachtung der Bewegung nicht an. Wird dem Puffer ein Anteil an Agarose zugegeben, ändert sich die Bewegung der Nematoden. Zwar sinkt die mittlere Verschiebung auf kurzen Zeitskalen zunächst, aber die Streuung der einzelnen Verschiebungen nimmt mit steigendem Agarose-Anteil ab. Damit wird die Bewegung der Nematoden gleichmäßiger. Entscheidender jedoch ist, dass die Anomalie der Nematoden-Bewegung kontinuierlich mit zunehmendem Agarose-Anteil in der Lösung steigt. Bei einer Agarose-Konzentration der Lösung zwischen 0,3 % und 0,4 % hat die Anomalie mit 1,44 ihren maximalen Wert erreicht. In diesem Bereich können sich die Nematoden am effektivsten fortbewegen (optimaler Bereich). Bei einer weiteren Erhöhung des Agarose-Anteils in der Lösung sinkt der Anomalie-Parameter wieder leicht ab, bleibt aber auf einem hohen Niveau. Durch die zusätzliche Auswertung der 'mean first passage time' konnten die Ergebnisse der Anomalie-Betrachtung bestätigt werden. In Lösungen mit einem Agarose-Anteil zwischen 0,3 % und 0,5 % ist die 'mean first passage time' auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen deutlich kleiner als in den Lösungen, die einen geringen Agarose-Anteil haben. Durch die Auswertung der mittleren Wegeffizienz konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Nematoden in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil nicht in der Lage sind, Entfernungen auf geradem Weg zurückzulegen, sondern große Umwege bei ihrer Fortbewegung machen. Erst wenn die Agarose-Konzentration der Lösung erhöht wird, können die Nematoden größere Distanzen auf direktem Weg zurücklegen. Bei der Analyse der Körperform der Nematoden stellte sich heraus, dass die mittlere Periodendauer in Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (nahezu) konstant ist. Erst ab einem Agarose-Anteil der Lösung von 0,2 % beginnt die mittlere Periodendauer mit zunehmender Agarose-Konzentration kontinuierlich zu steigen. Auch die mittlere lokale Krümmung der Nematoden steigt zunächst mit zunehmendem Agarose-Anteil der Lösung. Im Gegensatz zur mittleren Periodendauer hat jedoch die mittlere lokale Krümmung ihr Maximum in einer Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil und steigt nicht weiter an. Die mittlere maximale Auslenkung der Mittelpunkte fällt mit steigendem Agarose-Anteil der Lösung. Da auch die Streuung der maximalen Auslenkung abnimmt, wird die Bewegung der Nematoden mit steigender Agarose-Konzentration der Lösung direkter (kleinere Auslenkungen) und gleichmäßiger (kleinere Streuung). Dies konnte auch bei der Analyse der Verschiebungen festgestellt werden.

Resümee

Die Auswertung der **Verschiebung** ergab, dass bei hohen Aufnahme-Geschwindigkeiten (\ll Periodendauer) die mittlere Verschiebung der Mittelpunkte in reinem M9-Puffer am größten ist und mit steigender Agarose-Konzentration der Umgebung kontinuierlich abnimmt. Da auch die Streuung der Verschiebung mit steigendem Agarose-Anteil der Lösung abnimmt, wird mit zunehmender Agarose-Konzentration die Bewegung der Nematoden gleichmäßiger.

Bei der Betrachtung des **Anomalie-Parameters** zeigte sich, dass auf kurzen Zeitskalen die Nematoden-Bewegung in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) rein diffusiv ist. Hingegen ist auf langen Zeitskalen die Anomalie der Nematoden-Bewegung immer größer als 1. Darüber hinaus wurde auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen festgestellt, dass die Bewegung der Nematoden ab einem Agarose-Anteil der Lösung von 0,2 % superdiffusiv ist und der Anomalie-Parameter in Lösungen mit mittlerer Agarosekonzentration (0,3 % - 0,4 %) maximal wird (optimaler Bereich).

Die Analyse der '**mean first passage time**' ergab, dass die '**mean first passage time**' der Nematoden in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) wesentlich kleiner ist als in Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration. Auch ist in Umgebungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) die '**mean first passage time**' (nahezu) konstant und unabhängig von der exakten Agarose-Konzentration der Lösung. Hingegen kann in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,2 %) bereits eine kleine Änderung der Agarose-Konzentration größere Änderungen der '**mean first passage time**' hervorrufen.

Bei der Betrachtung der selbst definierten **mittleren Wegeffizienz** wurde festgestellt, dass in Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) die Nematoden nicht in der Lage sind, längere Strecken auf direktem Weg zurückzulegen. Dies zeigte sich auf allen gemessenen Zeit- und Längenskalen. Demgegenüber sind in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) die Nematoden durchaus in der Lage, auch längere Distanzen ohne größere Umwege zu überwinden.

Mit zusätzlich ausgewerteten Größen zur Beschreibung der Körperform²² der Nematoden konnte gezeigt werden, dass die **mittlere Periodendauer** des Bewegungszyklus der Nematoden in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,2 %) nahezu konstant ist. Wird jedoch die Agarose-Konzentration der Lösung über 0,2 % erhöht, beginnt die mittlere Periodendauer kontinuierlich zu steigen. Dementsprechend hat die Nematoden-Bewegung in Lösungen mit 0,5 % Agarose-Anteil die größte mittlere Periodendauer.

Bei der Analyse der **mittleren lokalen Krümmung** wurde festgestellt, dass die Nematoden bei der Bewegung in einer Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil die maximale mittlere lokale Krümmung besitzen (optimaler Bereich). Im Gegensatz zur Periodendauer fällt die mittlere lokale Krümmung der Nematoden bei Erhöhung der Agarose-Konzentration auf 0,5 % wieder ab.

Die **maximale Auslenkung** der Mittelpunkte während einer Periode nimmt mit steigendem Agarose-Anteil der Lösung ab. Da die Streuung ebenfalls abnimmt, wird die Nematoden-Bewegung direkter (kleinere Auslenkungen) und gleichmäßiger (kleinere Streuung).

²² Die physikalischen Größen zur Beschreibung der Körperform der Nematoden wurden nur für die Tracking-Daten des Aufnahme-Verfahren II ausgewertet.

5.4 Diskussion

Die Abhängigkeit der Fortbewegung (bzw. der Fortbewegungsart) der Nematoden von ihrer näheren Umgebung wurde bereits in einigen Arbeiten untersucht (Fang-Yen, Raizen, & Trojanowski, 2016), (Gagnon, Keim, & Arratia, 2014), (Riley & Lauga, 2014). Dabei wurde immer wieder festgestellt, dass sich mehrere physikalische Messgrößen der Nematoden-Bewegung wie die Anomalie der Bewegung, die Periodendauer und die Auslenkung mit variierender Viskoelastizität der Umgebung ändern.

Beispielsweise wurde das Schwimmverhalten der Nematoden in unterschiedlich viskosen Umgebungen untersucht (Backholm, Kasper, Schulman, Ryu, & Dalnoki-Veress, 2015). Dazu wurde der Schwanz der Nematoden mit einer Pipette fixiert (Micropipette deflection) und anschließend die Verformung ihres Körpers in unterschiedlich viskosen Umgebungen untersucht (siehe Abbildung 92). Für die viskosen Umgebungen wurde dabei M9-Puffer mit unterschiedlichen Anteilen an Polyethylenglycol verwendet (0 % - 15 %). Die Aufnahme-Geschwindigkeit des (statischen) Tracking-Systems betrug 56 Bilder pro Sekunde. In diesem Experiment wurden (unter anderem) die Frequenz, die Amplitude und die Wellenlänge der Nematoden-Bewegung in den unterschiedlichen Umgebungen ausgewertet.

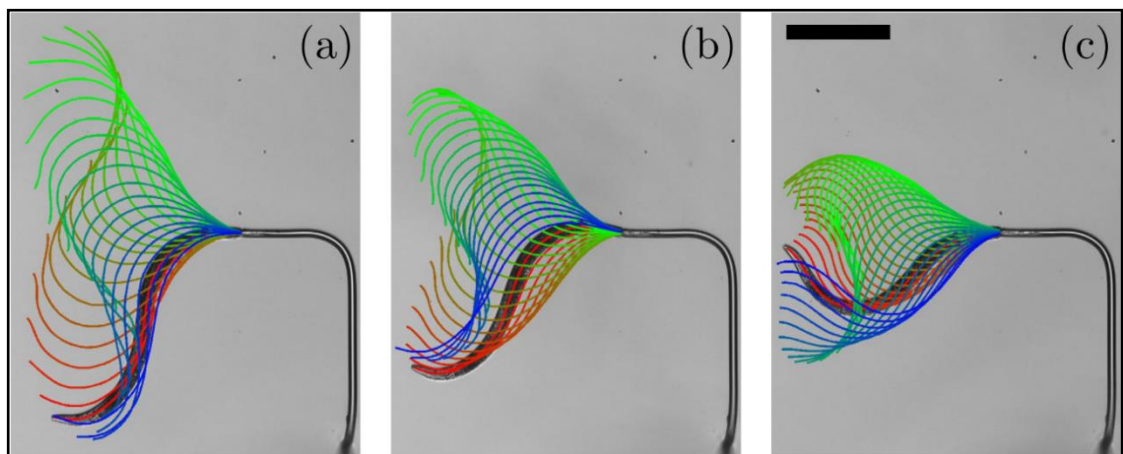


Abbildung 92: Die Abbildung zeigt das Schwimmverhalten eines Nematoden in Umgebungen mit unterschiedlicher Viskosität. Die Viskosität der Umgebungen ist in (a) 1, (b) 2,8 und (c) 7,2 mPa·s. Die farbigen Linien sind die Mittelkurven des (am Schwanz) fixierten Nematoden. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Aufnahmen beträgt 1/56 Sekunde. Wie in den obigen Abbildungen deutlich zu erkennen ist, ist die Auslenkung der Nematoden in Flüssigkeiten mit geringer Viskosität (a) deutlich größer als in Flüssigkeiten mit hoher Viskosität (c). Die Länge des schwarzen Balkens in (c) beträgt 200 µm.

Quelle: Backholm, Kasper, Schulman, Ryu, & Dalnoki-Veress, 2015

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Viskosität der Umgebung die Frequenz, die Amplitude und die Wellenlänge der Nematoden-Bewegung kontinuierlich abnimmt. Dies passt hervorragend zu unseren Ergebnissen, da auch in unserem Experiment mit zunehmenden Agarose-Anteil der Lösungen die mittlere maximale Auslenkung der Mittelpunkt abnahm.

Für eine Analyse der Muskelaktivität während der Fortbewegung von *C. elegans* wurden unter anderem auch die Periodendauer und Auslenkung der Nematoden in unterschiedlichen Umgebungen untersucht (Butler, et al., 2014). Um den Zusammenhang zwischen Muskelaktivität und Körperkrümmung während der Bewegung zu untersuchen, wurde ein spezielles Tracking-

System (einschließlich Fluoreszenzspektroskopie) entwickelt, das eine Aufnahme-Geschwindigkeit von 26 Bildern pro Sekunde hat und ein dynamisches Tracking (xy-Stage) ermöglicht. Als Umgebungen wurden in diesem Experiment M9-Puffer mit unterschiedlichem Anteil an Dextran (0 - 80 %) verwendet. Es zeigte sich, dass mit zunehmenden Anteil an Dextran in der Lösung die mittlere Periodendauer und die Auslenkung (im Vergleich zur Körperlänge) abnimmt (siehe Abbildung 93). Die Zunahme der mittleren Periodendauer und die gleichzeitige Abnahme der mittleren maximalen Auslenkung mit steigender Agarose-Konzentration der Lösung ist auch ein Ergebnis unserer quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik. Des Weiteren gilt: Je kleiner die Periodendauer der Bewegung ist, desto größer ist die Verschiebung des Mittelpunkts auf kurzen Zeitskalen (\ll Periodendauer). Damit lässt sich auch (die von uns mit den Aufnahme-Verfahren I und II gemessene) abnehmende mittlere Verschiebung bei steigender Agarose-Konzentration der Lösung erklären.

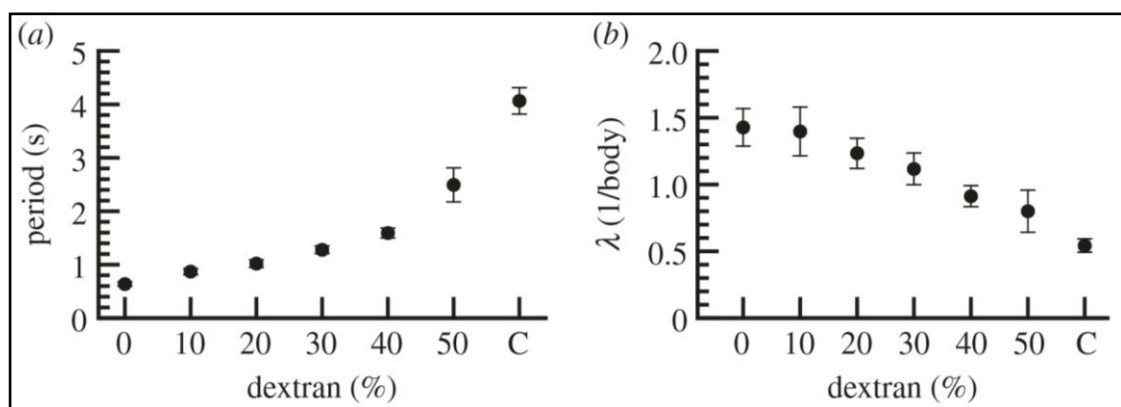


Abbildung 93: Um den Zusammenhang zwischen der Fortbewegungsart und der Muskelaktivität zu untersuchen, wurde in einem Experiment die mittlere Periodendauer **(a)** und die Auslenkung **(b)** (im Verhältnis zur Körperlänge) in Lösungen aus M9-Puffer mit variierendem Anteil an Dextran gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmenden Dextran-Anteil in der Lösung die mittlere Periodendauer steigt und im Gegensatz dazu die mittlere Auslenkung abnimmt.

Quelle: Butler, et al., 2014

Um die Bewegung der Nematoden in einer newtonschen und einer viskosen Flüssigkeit vergleichen zu können, wurden die auftretenden Strömungsfelder gemessen, die die Nematoden bei ihrer Fortbewegung durch die beiden Flüssigkeiten hervorrufen (Shen & Arratia, 2011). In diesem Versuch wurde als newtonsche Flüssigkeit eine Mischung aus zwei Halogenkohlenwasserstoff-Ölen verwendet. Für die viskose Flüssigkeit wurde Wasser mit kleinen Mengen an Carboxymethylcellulosen verwendet. Die Bewegung der Nematoden in den unterschiedlichen Flüssigkeiten wurde dabei für 10 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 125 Bilder pro Sekunde aufgenommen. Anschließend wurden (auch) die mittlere quadratische Verschiebung und die Anomalie der Bewegung der Nematoden in den beiden Flüssigkeiten berechnet (siehe Abbildung 8 Grundlagenteil). Zum einen zeigte sich die typische Wellenform der MSD's der Nematoden-Bewegung und zum anderen hatte die Bewegung der Nematoden in einer newtonschen und einer viskosen Flüssigkeit unterschiedliche Anomalie-Parameter. Der Anomalie-Parameter war in der newtonschen Flüssigkeit (mit 1,7) größer als in der viskosen Flüssigkeit (mit 1,4). Die Abhängigkeit des Anomalie-Parameters von der Viskoelastizität der Umgebung wurde auch in unserer Bewegungsanalyse festgestellt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass es eine maximale Agarose-Konzentration gibt, bis zu der die Anomalie der Nematoden-Bewegung steigt (0,3 % - 0,4 %). Bei noch höheren Agarose-Konzentrationen (0,5 %) fällt der Anomalie-Parameter der Nematoden-Bewegung wieder ab.

Erkenntnisse aus unserer quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik:

Mit der durchgeführten Analyse konnten die folgenden (neuen) Erkenntnisse über die Fortbewegung der Nematoden gewonnen werden:

- a) Mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung wird die Bewegung der Nematoden gleichmäßiger und direkter (siehe: mittlere Verschiebung, mittlere Wegeffizienz, mittlere max. Auslenkung).
- b) Ab einer Agarose-Konzentration der Lösung von 0,2 % ist die Bewegung der Nematoden auf allen (gemessenen) Zeit- und Längenskalen superdiffusiv. Ist der Agarose-Anteil der Lösung unterhalb von 0,2 %, lässt sich für kurze Zeit die Bewegung der Nematoden mit den Gesetzen der normalen Diffusion (Anomalie-Parameter ≈ 1) beschreiben (siehe: Anomalie der Bewegung).
- c) Für längere Beobachtungszeiten (Aufnahme-Verfahren III) ist die Bewegung der Nematoden in allen (gemessenen) viskoelastischen Umgebungen immer superdiffusiv (siehe: Anomalie der Bewegung).
- d) Für die Fortbewegung der Nematoden existiert ein optimal viskoelastischer Bereich, in dem die Anomalie der Bewegung maximal und die 'mean first passage time' minimal ist (siehe: Anomalie der Bewegung, 'mean first passage time').
- e) Die Nematoden können nur in Lösungen mit einer Agarose-Konzentration von mindestens 0,3 % längere Strecken auf direktem Weg zurücklegen (Dies konnte mit der eigens definierten Messgröße „mittlere Wegeffizienz“ für alle Zeit- und Längenskalen gezeigt werden).
- f) In Umgebungen mit hohem Agarose-Anteil (0,3 % - 0,5 %) erreichen die Nematoden wesentlich schneller das erste Mal einen beliebigen Abstand von ihrem Startpunkt (siehe: 'mean first passage time').
- g) Im Gegensatz zur mittleren Periodendauer (bzw. mittleren max. Auslenkung) besitzt die mittlere Krümmung der Nematoden ihr Maximum im optimal viskoelastischen Bereich und steigt (bzw. fällt) nicht weiter mit zunehmenden Agarose-Anteil der Lösung (siehe: mittlere Periodendauer, mittlere lokale Krümmung, mittlere max. Auslenkung).
- h) Aufgrund der großen Anzahl an aufgenommenen Messdaten (viele Nematoden und mehrere Stunden Messzeit in jeder einzelnen Umgebung) konnten Verteilungsfunktionen der ermittelten Messgrößen erstellt werden. Damit lässt sich das gesamte Spektrum der Nematoden-Bewegung in den unterschiedlichen Umgebungen betrachten.

Fazit:

Vergleicht man die Ergebnisse unserer quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik mit den Ergebnissen bereits vorhandener Arbeiten auf diesem Gebiet, so ist es gerechtfertigt zu sagen: Die erhaltenen Resultate passen gut mit den bereits vorhandenen Resultaten zusammen und erweitern diese in vielen Punkten.

Zum Schluss:

Die Unterschiede in der Effektivität der Nematoden-Bewegung können mit einer einfachen Betrachtung der Ergebnisse des Aufnahme-Verfahrens I verdeutlicht werden. Das Messprinzip dieses Verfahrens besteht darin, die Bewegung der Nematoden durch einen $2,0\text{ mm} \times 2,7\text{ mm}$ großen Bereich aufzunehmen. Eine Tracking-Sequenz beginnt, wenn der Nematode den Messbereich betritt. Verlässt der Nematode den Messbereich wieder, endet diese Tracking-Sequenz. Betrachtet man nun die Länge der Bahnkurven der einzelnen Tracking-Sequenzen, so zeigt sich, dass die Nematoden in den Lösungen mit den größeren Agarose-Konzentrationen im Schnitt einen kürzeren Weg zurücklegen, um den Messbereich zu durchqueren (siehe Abbildung 94).

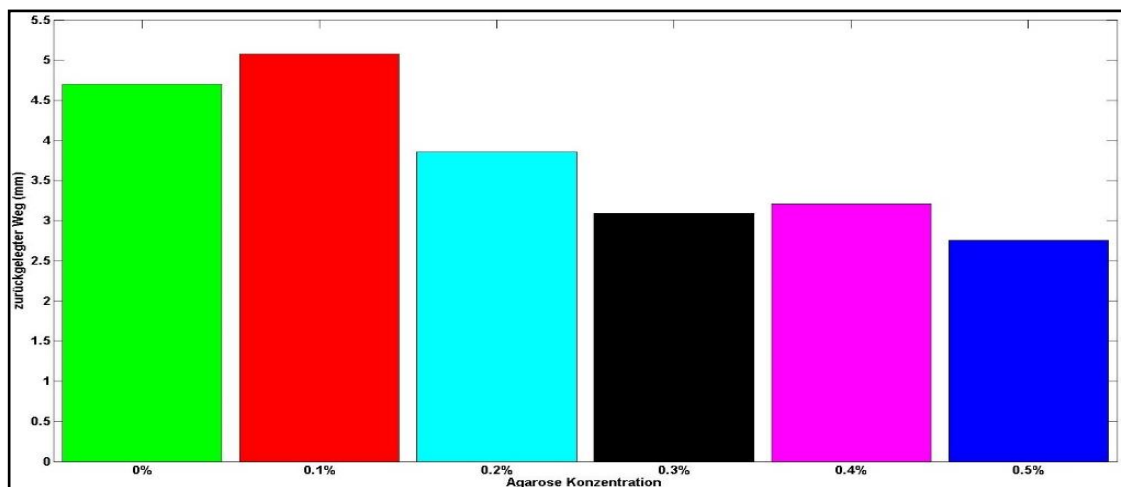


Abbildung 94: In dem obigen Histogramm sind die Wege eingezeichnet, die die Nematoden beim Durchqueren des Messbereichs des Aufnahme-Verfahren I zurücklegen (mittlere Länge der Bahnkurven). Wie aus der obigen Abbildung hervorgeht, nimmt der zurückgelegte Weg mit steigender Agarose-Konzentration ab. Zwar ist der zurückgelegte Weg in der Lösung mit 0,5 % Agarose-Konzentration am kürzesten, da aber die Periodendauer mit steigendem Agarose-Anteil (nahezu exponentiell) zunimmt, ist der Anomalie-Parameter in einer 0,5 %-igen Agarose-Lösung kleiner als in einer Lösung mit 0,4 % Agarose-Anteil.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
zurückgelegter Weg: [mm]	4,7	5,1	3,9	3,1	3,2	2,8

Tabelle 25: Mittelwerte der zurückgelegten Wege (Länge der Bahnkurven) bei der Durchquerung des Messbereichs des Aufnahme-Verfahren I.

6 Modellbildung und Diskussion

Mit den gewonnenen Daten aus der quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik konnte von uns ein neues Modell der Nematoden-Bewegung entwickelt werden. In diesem Modell werden die Positionsänderungen der Nematoden-Mittelpunkte während der Fortbewegung durch die unterschiedlichen Agarose-Lösungen simuliert.

6.1 Aufbau und die einzelnen Komponenten des Modells

Das eigenständig entwickelte Modell der Nematoden-Bewegung besteht aus zwei Komponenten:

- a) Der erste Teil des Modells (Simulation) beschreibt mit einem Random walk die Zufallsbewegung der Nematoden für Zeitschritte, die größer als die Periodendauer der Bewegung sind.
- b) Der zweite Teil beschreibt den sinusförmigen Bewegungszyklus, den die Nematoden während einer Periode ausführen.

Mit dieser Kombination lässt sich die Bewegung der Nematoden in allen (gemessenen) Umgebungen und auf allen Zeitskalen simulieren bzw. beschreiben.

Modell-Komponente 1 (Random walk):

Der erste Teil des Modells (Simulation) beschreibt die zufälligen Positionsänderungen der Nematoden-Mittelpunkte nach jeweils einer vollständigen Periode. D. h. die Zeitauflösung (Zeit zwischen zwei Sprüngen) dieses Random walks entspricht der (konzentrationsabhängigen) Periodendauer der Nematoden-Bewegung. Die Konstruktion dieses Random walks erfolgte in vier Schritten:

- a) Im ersten Schritt wurden aus den aufgenommenen Messdaten des zweiten Aufnahme-Verfahrens die
 - i. Verschiebung des Mittelpunkts nach einer vollständigen Periode (Periodenlänge)
 - ii. Richtungsänderung der Bewegung nach einer vollständigen Periode (Periodenwinkel)
 - iii. Dauer eines kompletten Bewegungszyklus (Periodendauer)

berechnet (siehe Kapitel 4.3). Diese drei physikalischen Größen wurden für jede Umgebung, in der die Bewegung der Nematoden experimentell untersucht wurde, ermittelt. (Mit dem selbst entwickelten Verfahren zur Bestimmung der Periodendauern ließen sich die benötigten Messgrößen einfach ermitteln.)

- b) Im zweiten Schritt wurden die normierten Verteilungen der in Punkt a berechneten physikalischen Größen gefittet. Dazu wurde jede einzelne Verteilung mit einer Fitfunktion angenähert. Die einzelnen Fitfunktionen hatten dabei immer die Form:

$$f(x) = \begin{cases} c_0 & \text{für } a_1 \leq x < a_2 \\ A_1 - e^{B_1 \cdot |x - C_1|} & \text{für } a_2 \leq x < a_3 \\ A_2 - e^{B_2 \cdot |x - C_2|} & \text{für } a_3 \leq x < a_4 \\ c_0 & \text{für } a_4 \leq x < a_5 \end{cases} \quad (25)$$

Mit der obigen Funktion ließ sich der Verlauf der Verteilungen (unabhängig von der physikalischen Größe und der Agarose-Konzentration der Umgebung) gut annähern (siehe Anhang: Verteilungen für die Simulation).

- c) Anschließend ist es mit der Inversionsmethode²³ möglich, aus gleichverteilten Zufallszahlen (mit den Umkehrfunktionen der aus Punkt b erhaltenen Funktionen) Zahlenreihen zu generieren, die die gleichen Wahrscheinlichkeitsverteilungen als die in Punkt a ermittelten physikalischen Größen besitzen. Für den Random walk wurden mit diesem Verfahren Zahlenreihen für die

- Periodenlängen (P),
- Periodenwinkel (W),
- Periodendauern (T)

erzeugt. (siehe Abbildung 95)

- d) Mit den aus Punkt c erhaltenen (drei) Zahlenreihen kann der Random walk der Nematoden-Bewegung konstruiert werden. Für die Position des Nematoden-Mittelpunkts im n -ten Zeitschritt gilt:

$$\begin{aligned} x(n) &= x(n-1) + P(n) \cdot \cos\left(\sum_{i=1}^n W_i\right) \\ y(n) &= y(n-1) + P(n) \cdot \sin\left(\sum_{i=1}^n W_i\right) \end{aligned} \quad (26)$$

, wobei P die generierte Zahlenfolge der Periodenlängen ist und W die Zahlenfolge der Periodenwinkel. Für die Dauer des n -ten Zeitschritts gilt: $\Delta t = T(n)$, mit T als die Zahlenfolge der Periodendauern. Damit entspricht jeder Zeitschritt in der Simulation genau einer Periodendauer (siehe Abbildung 96).

²³ Die Inversionsmethode ist ein Simulationsverfahren, mit dem (aus gleichverteilten Zufallszahlen) Zahlenreihen mit beliebiger Wahrscheinlichkeitsverteilung generiert werden können.

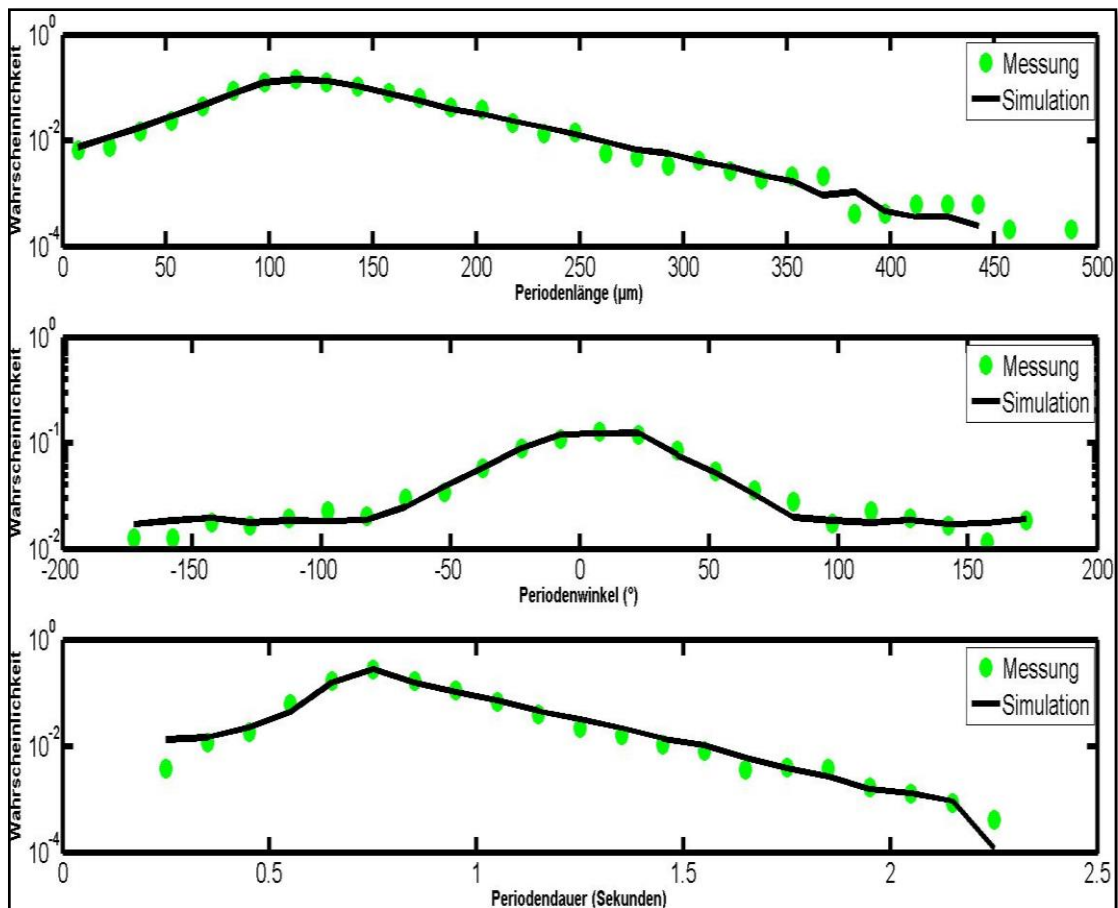


Abbildung 95: Vergleich der Wahrscheinlichkeitsverteilungen zwischen den gemessenen und generierten Werten der Periodenlänge, Periodenwinkel und Periodendauer für die Bewegung der Nematoden in reinem M9-Puffer. In der obigen Abbildung sind die normierten Verteilungen der gemessenen physikalischen Größen (grüne Punkte) und der daraus generierten Zahlenfolgen (schwarze Linien) eingezeichnet. Die gemessenen Werte stammen von der Bewegungsanalyse der Nematoden und die generierten Werte wurden mit der Inversionsmethode erzeugt. Für das Modell wurden Zahlenfolgen für (**oben**) die Periodenlänge, (**Mitte**) die Periodenwinkel und (**unten**) die mittlere Periodendauer erstellt.

Für den konstruierten Random walk gilt somit:

Die Längen der einzelnen Sprünge dieser Zufallsbewegung besitzen die gleiche Wahrscheinlichkeitsverteilung als die aus den Messungen erhaltenen Periodenlängen. Das Gleiche gilt für die Periodenwinkel und Periodendauern. Der Grund für die oben beschriebene Vorgehensweise bei der Konstruktion des Random walks ist, mit der Inversionsmethode lassen sich beliebig lange Zahlenreihen für die Periodenlängen, Periodenwinkel und Periodendauern erzeugen, für die gilt:

- sie besitzen die gleichen Wahrscheinlichkeitsverteilungen als die gemessenen physikalischen Größen.
- die Reihenfolge der einzelnen Zahlen einer Zahlenfolge ist rein zufällig.

Damit kann die Bewegung der Nematoden für jede beliebige Zeitspanne simuliert werden. Als Ergebnis dieses Teils der Simulation erhält man die Positionen der Mittelpunkte am Beginn bzw. am Ende jeder Periode nach beliebig vielen Periodendauern. Die Periodenlänge, der Periodenwinkel und die Periodendauer jeder (simulierten) Periode sind dabei unabhängig voneinander.

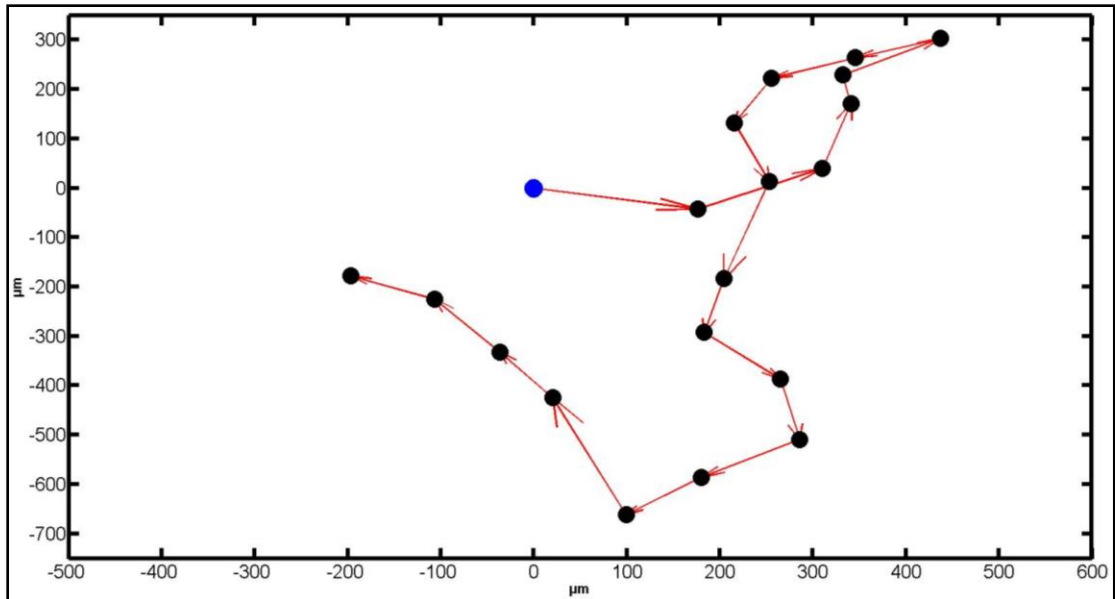


Abbildung 96: Positionen der Anfangs - bzw. Endpunkte einer Periode der Nematoden-Bewegung. Mit dem ersten Teil des Modells werden die einzelnen Positionen des Mittelpunkts nach jeweils einer vollständigen Periode bestimmt. Der Startpunkt der Simulation ist in blau eingezeichnet. Die Periodenlänge, der Periodenwinkel und die Dauer jeder Periode sind unabhängig voneinander.

Modell-Komponente II (periodische Bewegung):

Um die Zeitauflösung des Modells zu erhöhen, wird im zweiten Schritt der Random walk um eine periodische Bewegung erweitert. Dazu wird jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Punkten des Random walks (Startpunkte einer Periode) eine periodische Auslenkung der Mittelpunkte eingefügt (Bewegungszyklus). Wird für die Auslenkung der Mittelpunkte während der Periode eine Punktsymmetrie angenommen, kann der Bewegungszyklus mit einer Sinusfunktion beschrieben werden (siehe Abbildung 97). Damit ergeben sich die einzelnen Mittelpunkte (x_i, y_i) mit $i = 1, 2, 3, \dots, K$ des Bewegungszyklus im n -ten Zeitschritt mit:

$$y_i = A_0 \cdot \sin\left(\frac{2\pi}{P(n)} \cdot x_i\right) \quad (27)$$

Die Reihe $x = x_1, x_2, \dots, x_K$ legt die Anzahl und Position der Mittelpunkte des Bewegungszyklus fest. Daher muss für die Reihe x gelten:

- a) $x_1 = 0 \Rightarrow y_1 = 0$
- b) $x_K = P(n) \Rightarrow y_K = 0$ mit $K = fps \cdot T(n)$
- c) $x_{i+1} - x_i = \text{const.}$ (Alle Punkte haben den gleichen x-Abstand voneinander)

, wobei fps die simulierte Aufnahme-Geschwindigkeit der Kamera ist und $T(n)$ die Periodendauer und $P(n)$ die Periodenlänge des n -ten Zeitschritts sind. Daraus folgt:

- der Zeitschritt zwischen zwei Punkten des Bewegungszyklus ist gegeben mit $1/fps$
- die gesamte Dauer des eingefügten Bewegungszyklus entspricht der Periodendauer $T(n)$.
- die Periodenlänge $P(n)$ und die komplette Verschiebung des Mittelpunkts während des Bewegungszyklus sind identisch.
- jeder Bewegungszyklus besteht aus einer vollständigen Schwingung. D. h. in jedem Bewegungszyklus durchläuft der Sinus die Werte zwischen 0 und 2π .

A_0 ist die konstante Amplitude der Auslenkung, die nur abhängig ist von der Agarose-Lösung, in der die Bewegung der Nematoden simuliert wird. Die Amplitude entspricht der mittleren maximalen Auslenkung der Mittelpunkte auf der Bahnkurve (siehe Kapitel 5.3)

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Amplitude: [μm]	60	54	46	46	39	39

Tabelle 26: Die konstanten Amplituden des Bewegungszyklus.

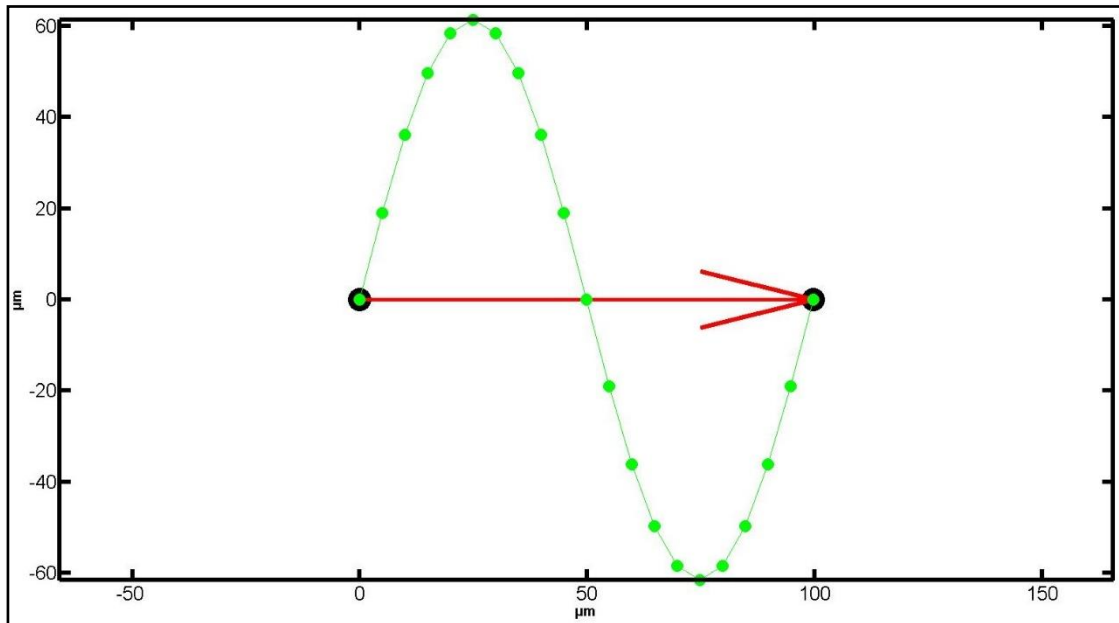


Abbildung 97: Bewegungszyklus einer Periode. Die beiden schwarzen Punkte sind zwei aufeinanderfolgende Startpunkte einer Periode (Random walk) und der Verschiebungsvektor der Periode ist in Rot eingezeichnet. Im zweiten Schritt des Modells wird zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden Startpunkten einer Periode ein sinusförmiger Bewegungszyklus (grüne Punkte) eingefügt. (Modell-Komponente II)

Zusammenführung der beiden Komponenten:

Im letzten Schritt wird der Bewegungszyklus während der Periode (Teil II) und der Random walk der Anfangspunkte einer Periode (Teil I) zusammengeführt. Dazu werden alle Punkte des Bewegungszyklus (siehe Abbildung 98 a)

- um den Periodenwinkel gedreht (siehe Abbildung 98 b)
- die gedrehten Punkte des Bewegungszyklus an der richtigen Stelle (Startpunkt der Periode) positioniert (siehe Abbildung 98 c).

Nach dieser Zusammenführung müssen der Endpunkt der Periode (Teil I) und der letzte Punkt des Bewegungszyklus (Teil II) die gleichen Koordinaten besitzen (siehe Abbildung 98 d). Nach diesem Prinzip wird jedem Startpunkt einer Periode ein angepasster Bewegungszyklus zugeordnet. Jeder Endpunkt einer Periode ist auch gleichzeitig der Startpunkt einer neuen Periode. Mit dem beschriebenen Verfahren lassen sich beliebig viele Perioden der Nematoden-Bewegung simulieren, d. h. bei diesem Verfahren werden immer ganze Perioden simuliert. Die Anzahl an Perioden einer simulierten Tracking-Sequenz kann frei gewählt werden. Als Ergebnis dieser Simulation erhält man die Koordinaten aller Mittelpunkte eines Nematoden bei seiner Fortbewegung durch die unterschiedlichen Umgebungen.

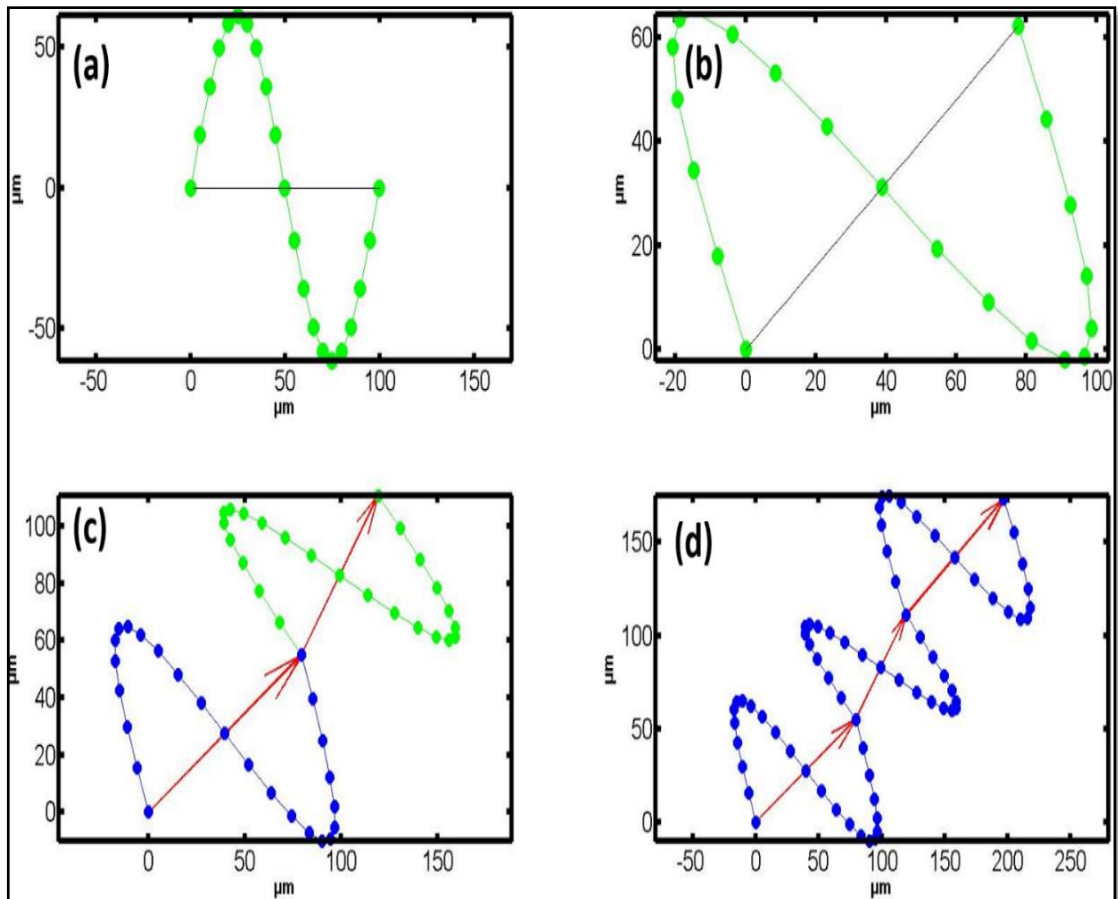


Abbildung 98: (a) Die Verschiebung des Bewegungszyklus einer Periode (x-Abstand zwischen dem ersten und letzten Punkt der Sinuskurve) entspricht genau der Periodenlänge. Im ersten Schritt wird der Bewegungszyklus um den Periodenwinkel gedreht (b) und anschließend an der richtigen Stelle positioniert (c). Die Simulation wird mit diesem Verfahren immer stückweise (um eine Periode) erweitert (d).

6.2 Auswertung und Ergebnisse der simulierten Tracking-Sequenzen

Für die Aufbereitung und Qualitätskontrolle der simulierten Tracking-Sequenzen konnten die bereits bei den Messungen verwendeten Programme (in geringfügig veränderter Form) erneut verwendet werden, da die simulierte Nematoden-Bewegung mit den gleichen physikalischen Größen untersucht wurde, mit denen bereits die (gemessenen) Tracking-Sequenzen analysiert wurden. Für jede viskoelastische Umgebung, in der die Fortbewegung der Nematoden experimentell untersucht wurde, wurden 500 simulierte Tracking-Sequenzen ausgewertet. Die mittlere Dauer einer simulierten Tracking-Sequenz ist 30 Sekunden und der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mittelpunkten beträgt $1/30$ Sekunde. Dies entspricht genau der Tracking-Geschwindigkeit des zweiten Aufnahme-Verfahrens.

Aufbereitung der simulierten Daten:

Die simulierten Daten sind in ihrer Struktur den realen Messdaten sehr ähnlich, da sowohl die Messungen als auch die Simulationen aus lauter einzelnen Tracking-Sequenzen unterschiedlicher Länge bestehen. Deshalb konnte die Aufbereitung und Qualitätskontrolle der simulierten Daten nach dem gleichen Prinzip erfolgen, das bereits bei den Messungen verwendet wurde. Allerdings beschränkte sich bei der Simulation die Aufbereitung und Qualitätskontrolle der Daten auf die Analyse des Anomalie-Parameters (Kapitel 4.3). Daher wurde zunächst der Anomalie-Parameter jeder simulierten Tracking-Sequenz bestimmt. Hierfür konnte das bereits vorhandene Programm aus dem Kapitel 4.3 (Bewegungsanalyse) in leicht abgeänderter Form erneut verwendet werden.

Bewegungsanalyse:

Die benötigten (Kontroll-)Einstellungen wurden direkt von der Bewegungsanalyse der Messdaten des Aufnahme-Verfahren II übernommen. Auch die Funktionsweise des Programms 'Bewegungsanalyse' wurde nicht geändert²⁴. Ist der Anomalie-Parameter einer simulierten Tracking-Sequenz zwischen 0,3 und 3 und ist die Sequenzdauer mindestens 25 Sekunden (entspricht 750 Mittelpunkten), wird die entsprechende Sequenz bei der nachfolgenden Analyse der Bewegungsdynamik verwendet.

Auswertung der Daten:

Nach dieser „verkürzten“ Aufbereitung und Qualitätskontrolle erfolgte die Auswertung der simulierten Tracking-Sequenzen. Da das entwickelte Modell die Bewegung der Nematoden-Mittelpunkte simuliert, wurden für die Analyse der Bewegungsdynamik nur diejenigen physikalischen Größen ausgewertet, für deren Berechnung ausschließlich die Mittelpunkte der Nematoden benötigt werden. Neben dem Anomalie-Parameter wurden somit die Verschiebung der Mittelpunkte, die 'mean first passage time' und die mittlere Wegeffizienz berechnet. Für die Auswertung der simulierten Tracking-Sequenzen konnten die Matlab-Programme, die zur Auswertung der Messdaten entwickelt wurden, wieder verwendet werden. Daher mussten für die Auswertung der simulierten Daten keine neuen Programme entwickelt bzw. geschrieben werden.

²⁴ Die einzelnen Schritte des Programms 'Bewegungsanalyse' zur Berechnung des Anomalie-Parameters jeder (simulierten) Tracking-Sequenz wurden bereits im Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben.

Verschiebung der Mittelpunkte:

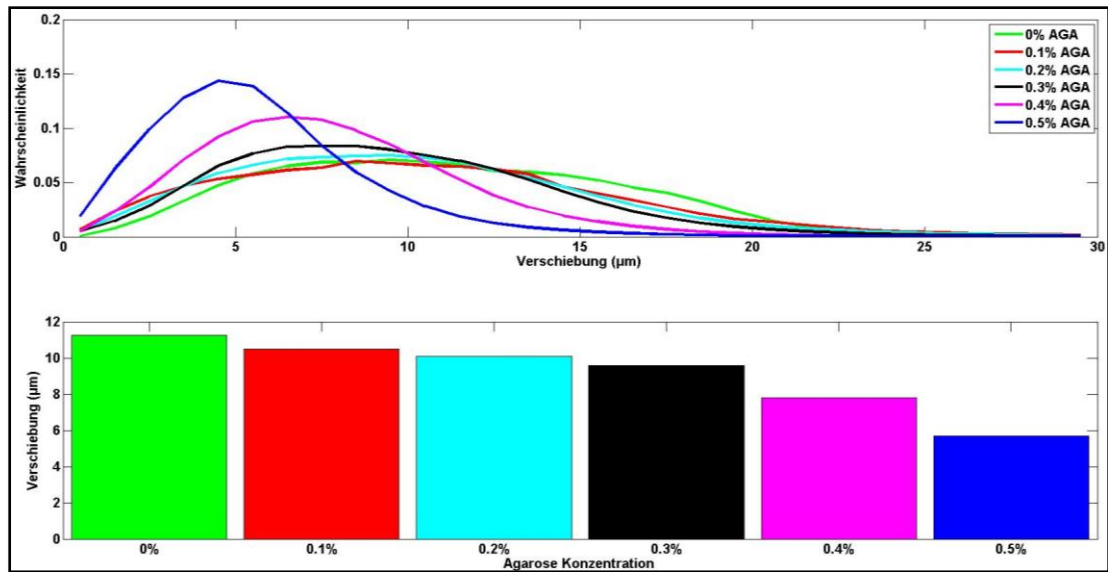


Abbildung 99: (oben) normierte Verteilungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Verschiebung: [μm]	12	11	10	9	8	6
Standardabweichung: [μm]	5	6	5	5	4	3

Tabelle 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verschiebungen in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Anomalie-Parameter

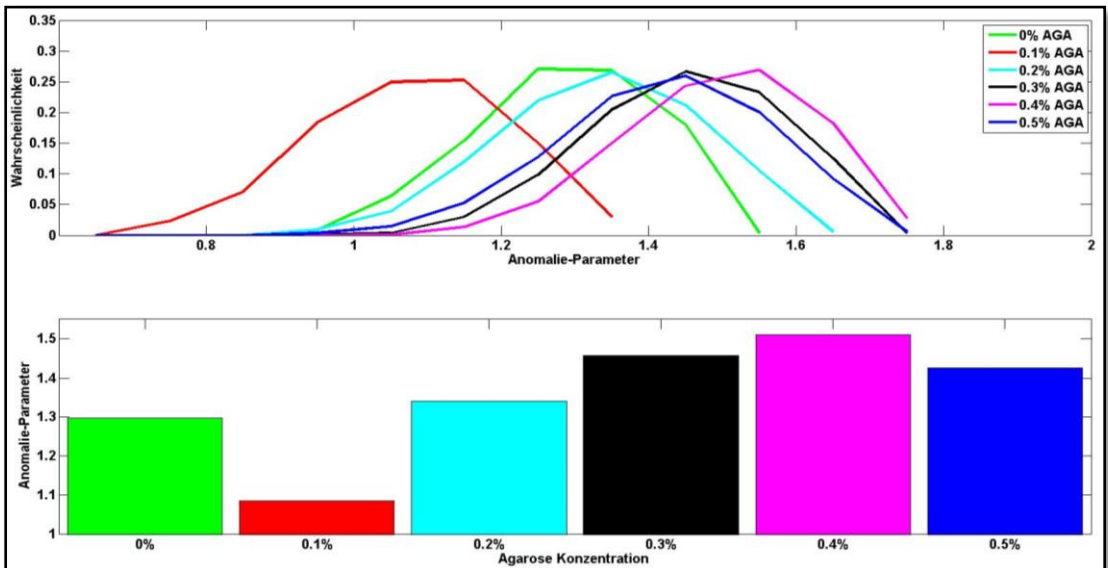


Abbildung 100: (oben) normierte Verteilungen der Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anomalie:	1,29	1,08	1,34	1,45	1,51	1,42
Standardabweichung:	0,10	0,11	0,12	0,11	0,11	0,12

Tabelle 28: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anomalie-Parameter in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

Mean first passage time:

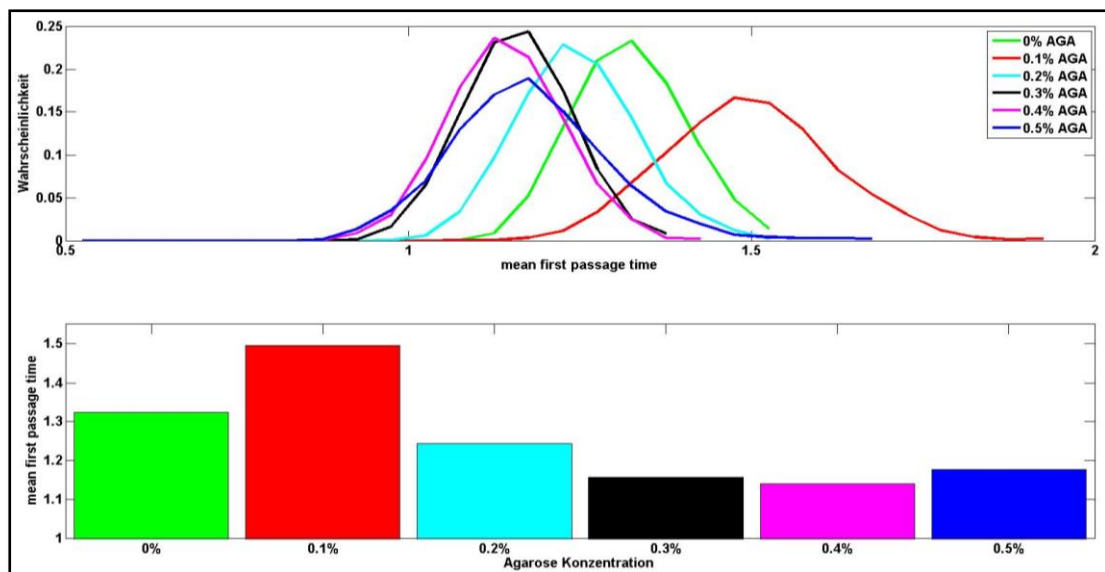


Abbildung 101: (oben) normierte Verteilung der 'mean first passage time' in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte.

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mean first passage time:	1,32	1,49	1,24	1,15	1,14	1,17
Standardabweichung:	0,07	0,11	0,07	0,06	0,07	0,10

Tabelle 29: Mittelwerte und Standardabweichungen der 'mean first passage time' für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen.

mittlere Wegeffizienz:

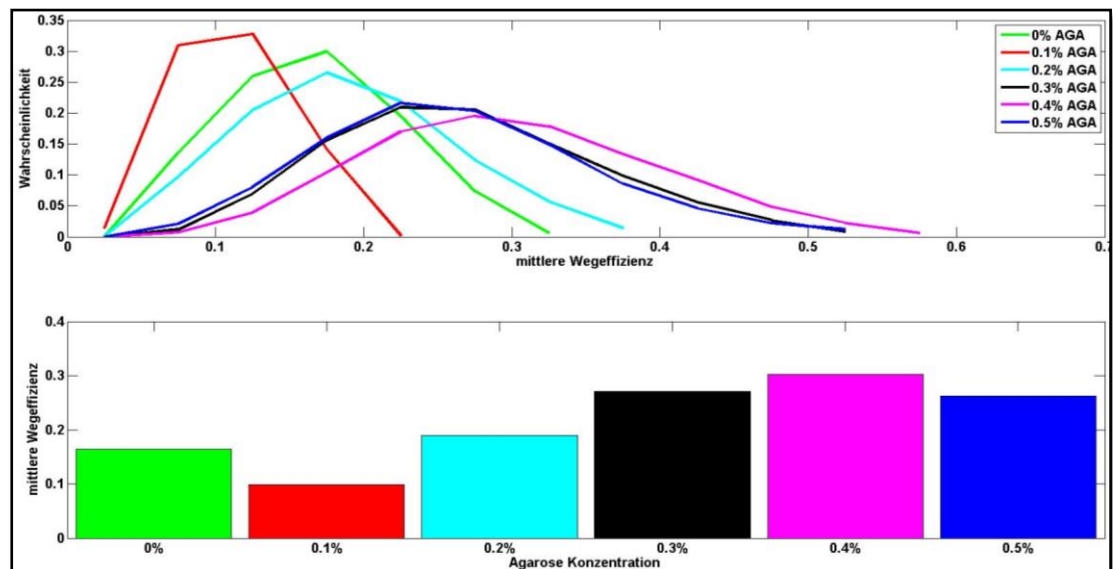


Abbildung 102: (oben) normierte Verteilungen der mittleren Wegeffizienz in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
mittlere Wegeffizienz:	0,17	0,10	0,19	0,28	0,31	0,27
Standardabweichung:	0,05	0,03	0,06	0,08	0,09	0,08

Tabelle 30: Mittelwerte und Standardabweichungen der mittleren Wegeffizienz für die unterschiedlichen Agarose-Lösungen

Resümee (Simulation)

Die **mittlere Verschiebung** nimmt mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung kontinuierlich ab. D. h. die (simulierte) Positionsänderung ist auf kurzen Zeitskalen in den Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration am größten. Die Streuung der einzelnen Verschiebungen nimmt ebenfalls mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung ab. Damit ist die (simulierte) Bewegung der Nematoden in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil gleichmäßiger.

Die **Anomalie** der (simulierten) Nematoden-Bewegung ist auf langen Zeitskalen (min. 25 Sekunden) in allen Agarose-Lösungen immer größer als 1. Ab einer Agarose-Konzentration der Lösung von 0,2 % beginnt die Anomalie deutlich zu steigen. Der Anomalie-Parameter hat bei den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %) seinen maximalen Wert erreicht. Steigt die Agarose-Konzentration der Lösung über 0,4 % an, sinkt der Anomalie-Parameter wieder leicht ab, bleibt aber auf hohem Niveau (Superdiffusion).

Die '**mean first passage time**' ist in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil wesentlich geringer als in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil. Damit benötigen die Nematoden in Lösungen mit einem hohen Agarose-Anteil im Durchschnitt eine kürzere Zeit, um eine bestimmte Distanz zurückzulegen. Auch ist die 'mean first passage time' in Lösungen mit hoher Agarose-Konzentration nahezu unabhängig von dem genauen Agarose-Anteil der Lösung. Bei geringen Konzentrationen hingegen kann sich bereits bei einer kleinen Änderung des Agarose-Anteils der Lösung die 'mean first passage time' der Nematoden deutlich ändern.

In Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration können die Nematoden keine längeren Strecken auf geradlinigem Weg zurücklegen. Bei der Bewegung der Nematoden in Lösungen mit geringem Agarose-Anteil (0 % - 0,1 %) konnte in keiner einzigen Tracking-Sequenz eine höhere **mittlere Wegeffizienz** als 0,3 festgestellt werden. Bewegen sich hingegen die Nematoden in Lösungen mit hoher Agarose-Konzentration (0,3 % - 0,5 %), können sie auch beim Zurücklegen längerer Distanzen noch eine mittlere Wegeffizienz von größer als 0,5 erreichen. Damit sind die Nematoden in Lösungen mit hohem Agarose-Anteil in der Lage, auch längere Strecken ohne größere Umwege auf direktem Weg zu überwinden.

Anmerkung:

Mit der quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik der simulierten Tracking-Sequenzen konnte gezeigt werden, dass sich die Bewegung der Nematoden durch die unterschiedlichen Umgebungen mit einer Kombination aus Random walk und periodischer Bewegung gut beschreiben lässt (siehe Abbildung 103). Alle (zentralen) Beobachtungen aus den Experimenten konnten mit dem von uns entwickelten Modell reproduziert werden. Die genauen Werte der betrachteten physikalischen Größen sind in dem Modell etwas optimaler als in den Messungen. Der Grund hierfür ist, dass bei der Simulation nahezu keine Tracking-Sequenzen entstehen, bei der die simulierte Bewegung der Nematoden einen Anomalie-Parameter unterhalb von 0,8 besitzt (abgesehen vielleicht von den Tracking-Sequenzen in der 0,1 %-igen Agarose-Lösung). Bei den Messungen hingegen wurden alle Tracking-Sequenzen für die quantitative Analyse der Bewegungsdynamik verwendet, bei der die Bewegung des beobachteten Nematoden einen größeren Anomalie-Parameter als 0,3 hatte. Würde man alle gemessenen Tracking-

Sequenzen mit einem Anomalie-Parameter kleiner als 0,8 für die Analyse der Bewegungsdynamik entfernen, wären die ausgewerteten physikalischen Größen des Modells und der Messung (nahezu) deckungsgleich.

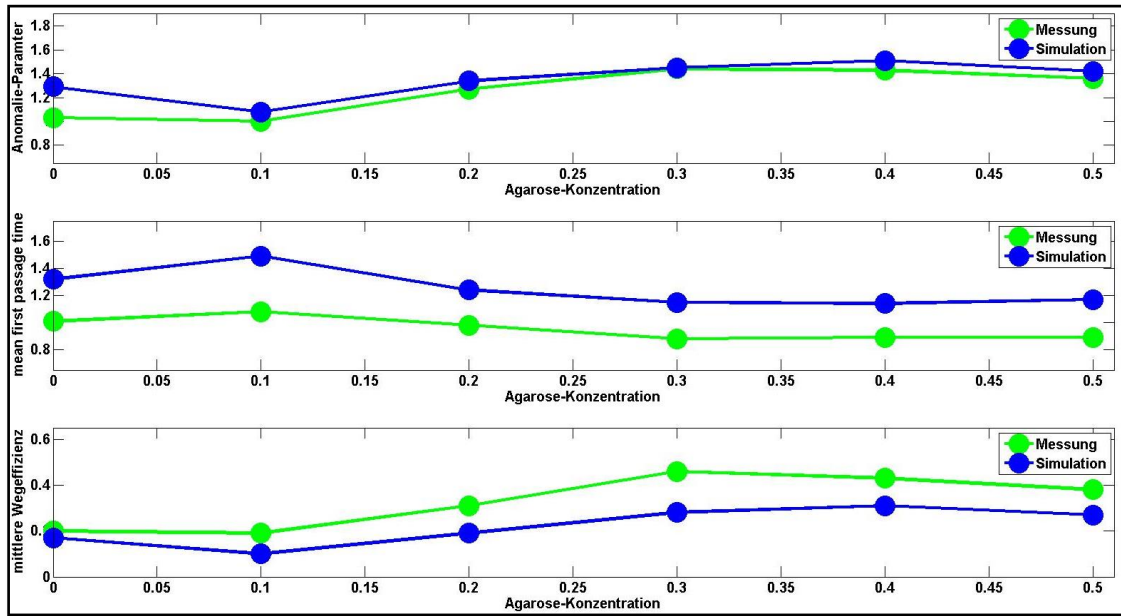


Abbildung 103: Vergleich zwischen der gemessenen und simulierten Bewegung der Nematoden. In der obigen Abbildung sind die (über die drei Aufnahme-Verfahren) gemittelten Messdaten und die simulierten Daten der **(oben)** Anomalie-Parameter, **(Mitte)** 'mean first passage time' und **(unten)** mittleren Wegeffizienz gezeigt.

6.3 Richtungsänderung der Nematoden während ihrer Fortbewegung

Mit den ermittelten Daten, die für die Konstruktion unseres Modells benötigt wurden, kann zusätzlich gezeigt werden, dass die Änderung der Bewegungsrichtung der Nematoden bereits nach wenigen Sekunden gleichverteilt ist. D. h. nach wenigen Sekunden bewegen sich die Nematoden in alle Richtungen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit fort. Darüber hinaus lässt sich noch die charakteristische Wellenform der mittleren quadratischen Verschiebung der Nematoden-Bewegung erklären.

Richtungsänderungen der Nematoden:

Um die Richtung der Bewegung bestimmen zu können, müssen zunächst die Verschiebungsvektoren der Nematoden-Mittelpunkte definiert werden. Ein Verschiebungsvektor ergibt sich immer aus der Differenz der Ortsvektoren zweier aufeinanderfolgender Mittelpunkte. Für den Verschiebungsvektor in der k -ten Aufnahme einer Tracking-Sequenz gilt somit:

$$\vec{v}_k = \vec{p}_{k+1} - \vec{p}_k \quad (28)$$

, mit \vec{p}_k als der Ortsvektor des k -ten Mittelpunkts. Die Richtungsänderung des k -ten Verschiebungsvektors nach j - Zeitschritten ist gegeben mit:

$$\alpha_j = \arccos\left(\frac{\vec{v}_k \cdot \vec{v}_{k+j}}{|\vec{v}_k| |\vec{v}_{k+j}|}\right) \quad (29)$$

Mit dem Winkel α_j zwischen den beiden Verschiebungsvektoren \vec{v}_k und \vec{v}_{k+j} kann die Änderung der Bewegungsrichtung beschrieben werden:

Die Richtungsänderung des Nematoden zwischen dem Zeitpunkt t_k und dem Zeitpunkt t_{k+j} entspricht genau dem Winkel zwischen den beiden Verschiebungsvektoren \vec{v}_k und \vec{v}_{k+j} .

Wird j auf 1 gesetzt, so ergibt sich die Richtungsänderung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verschiebungsvektoren. Die Zeitdifferenz hierfür entspricht der Zeit zwischen drei Aufnahmen der Kamera. Dies ist die kleinste Zeitauflösung, mit der die Änderung der Bewegungsrichtung gemessen werden kann. Wird hingegen j größer als 1 gesetzt, kann die Änderung der Bewegungsrichtung nach jeder beliebigen Zeit berechnet werden.

Verteilungsfunktionen der Bewegungsrichtung:

Werden die Änderungen der Bewegungsrichtung aller Verschiebungsvektoren für einen Zeitschritt j berechnet, erhält man die Verteilungsfunktion der Richtungsänderung, d. h. für jeden Zeitschritt j ergibt sich eine eigene Verteilungsfunktion (siehe Abbildung 104).

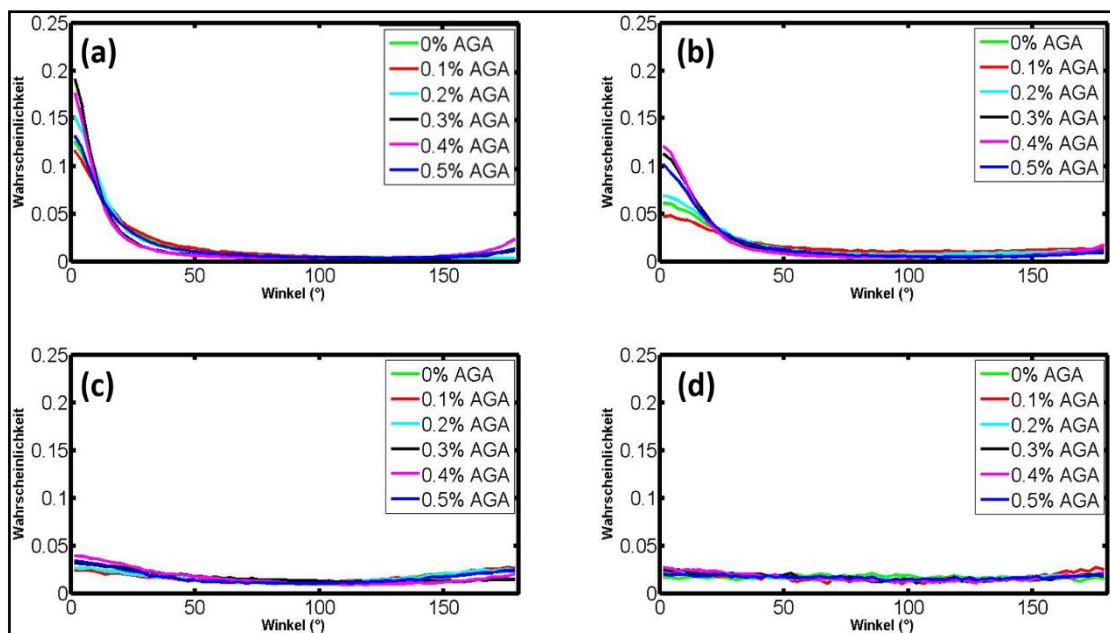


Abbildung 104: normierte Verteilungsfunktionen der Richtungsänderung für verschiedene Zeitschritte. Auf kurzen Zeitskalen ist die Richtungsänderung der Nematoden-Bewegung minimal. Mit zunehmender Zeit zerlaufen jedoch die Verteilungsfunktionen immer weiter bis hin zu einer Gleichverteilung. In den obigen Abbildungen sind die Verteilungen der Richtungsänderung nach (a) 1/15 Sekunde, (b) 1/3 Sekunde, (c) 1 Sekunde und (d) 3 Sekunden in den unterschiedlichen Agarose-Konzentrationen zu sehen.

Die kleinste Zeit, ab der alle Winkel zwischen 0° und 180° die gleiche Wahrscheinlichkeit haben, ist diejenige Zeit, ab der die Richtungsänderung der Nematoden-Bewegung gleichverteilt ist. Für $j = 1$ hat die Verteilung der Richtungsänderung noch ein deutliches Maximum bei 0° und einen schnellen Abfall der Wahrscheinlichkeiten für größere Winkel der Richtungsänderung (siehe Abbildung 104 a). Damit ist auf dieser Zeitskala (1/15 Sekunden) die Richtungsänderung der Nematoden mit großer Wahrscheinlichkeit nahe 0° . Wird jedoch der Zeitschritt j vergrößert, beginnen die Verteilungen zu zerlaufen bis hin zu einer Gleichverteilung (siehe Abbildung 104 b - d). Ab einer gewissen Größe von j ist die Wahrscheinlichkeit für alle Richtungsänderungen zwischen 0° und 180° gleich groß (siehe Abbildung 104 d). Mit der Beziehung $\Delta t = (j+1)/v$

kann anschließend aus dem Parameter j die Zeitdifferenz Δt bestimmt werden (v ist die Aufnahme-Geschwindigkeit und beträgt 30 s^{-1}).

Bei der Auswertung der einzelnen Verteilungsfunktionen zeigte sich, dass unabhängig von der Agarose-Lösung nach spätestens 3 Sekunden die Änderung der Bewegungsrichtung gleichverteilt ist. Dies entspricht in etwa 3 Periodendauern der Nematoden-Bewegung. Damit bewegen sich die Nematoden nach (spätestens) drei Bewegungszyklen in jede Richtung mit der gleichen Wahrscheinlichkeit.

charakteristische Form des MSD:

Mit unserem Modell der Nematoden-Bewegung kann eine einfache Erklärung für die Form der MSD's gegeben werden. Die typische Form der mittleren quadratischen Verschiebung (in Abhängigkeit der Zeit) einer Tracking-Sequenz lässt sich im loglog-Plot am besten als Überlagerung einer Geraden mit einer wellenförmigen Funktion (bzw. gedämpften Schwingung) beschreiben (siehe Abbildung 105 b). Diese spezielle Form zeigt sich sowohl in den MSD's der gemessenen Tracking-Sequenzen als auch in den MSD's der simulierten Tracking-Sequenzen. Der Grund hierfür liegt in der Kombination der Nematoden-Bewegung aus einer Zufallsbewegung auf größeren Zeitskalen und einer zyklischen Bewegung mit einer (umgebungsabhängigen) Periodendauer von etwa 1 Sekunde. Betrachtet man die Bewegung der Nematoden für größere Zeitschritte, d. h. es wird nur ein Punkt pro Periode (z. B. der Anfangspunkt jeder Periode) bei der Berechnung des MSD's berücksichtigt, ergibt sich die typische Gerade im loglog-Plot (siehe Abbildung 105 c). Werden die einzelnen Zeitschritte für die Berechnung des MSD's immer weiter verkleinert, entsteht die charakteristische Wellenform. Die Wellenlängen ergeben sich dabei aus den einzelnen Periodendauern der betrachteten Tracking-Sequenz. Wird aus mehreren Tracking-Sequenzen der Mittelwert der einzelnen Zeitpunkte des MSD's berechnet, verschwinden die Wellenzüge immer mehr. Dies liegt an den leicht unterschiedlichen Periodendauern der Nematoden-Bewegung in den unterschiedlichen Tracking-Sequenzen und den daraus resultierenden Wellenlängen des MSD's.

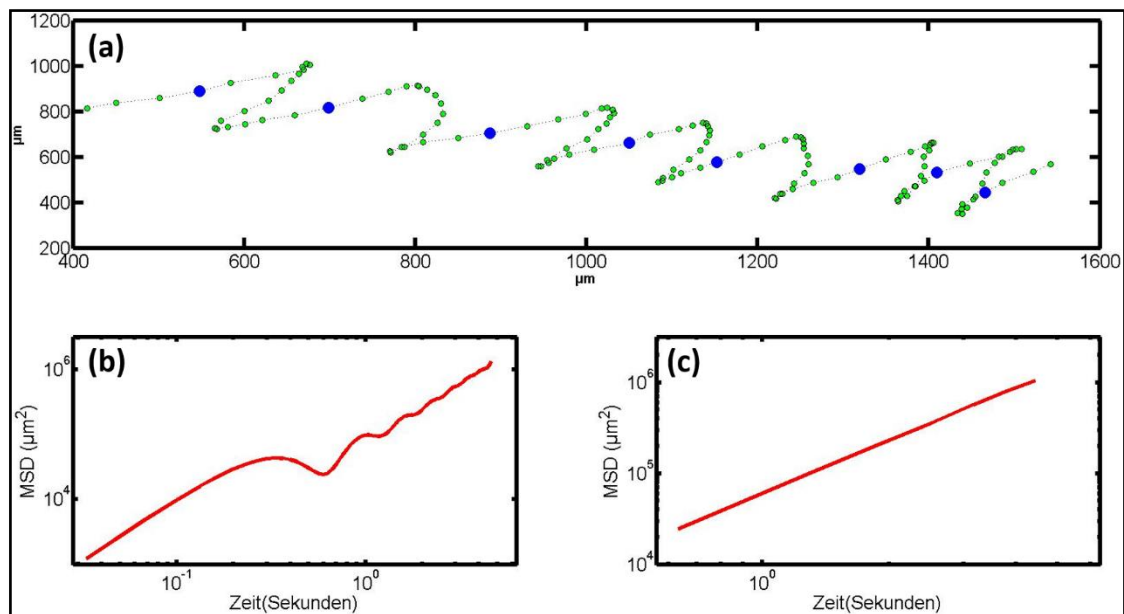


Abbildung 105: unterschiedliche Formen der MSD's einer Tracking-Sequenz. **(a)** Tracking-Sequenz eines Nematoden in reinem M9-Puffer (aufgenommen mit dem Aufnahme-Verfahren II). Der zeitliche Abstand zwischen zwei Punkten (grüne Punkte) beträgt $1/30$ Sekunden. Die Startpunkte jeder Periode sind in blau eingezeichnet. **(b)** mittlere quadratische Verschiebung aller Punkte und **(c)** die mittlere quadratische Verschiebung der Startpunkte jeder Periode.

6.4 Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Mit dem eigenständig entwickelten Modell zur Beschreibung der Nematoden-Bewegung in viskoelastischen Umgebungen konnten die experimentellen Ergebnisse der quantitativen Bewegungsanalyse reproduziert werden. In den simulierten Tracking-Sequenzen hatte die Bewegung der Nematoden ebenfalls in den mittleren Agarose-Konzentrationen (0,3 % - 0,4 %) ihr Optimum. Dies zeigte sich sowohl bei der Analyse des Anomalie-Parameters als auch der 'mean first passage time'. Die mittlere Wegeffizienz der Nematoden-Bewegung wurde ebenfalls in diesem Bereich maximal. Wie bereits im Experiment beobachtet, existierten auch in der Simulation für Lösungen mit geringer Agarose-Konzentration (0 % - 0,1 %) keine Tracking-Sequenzen mit einer mittleren Wegeffizienz von größer als 0,4. Hingegen waren in höheren Agarose-Konzentrationen deutlich größere Werte für die mittlere Wegeffizienz einer simulierten Tracking-Sequenz möglich. In der Simulation ergab sich auch die kontinuierliche Abnahme der mittleren Verschiebung (und deren Streuung) mit zunehmender Agarose-Konzentration der Lösung.

Mit dem Modell konnte somit gezeigt werden, dass sich die Bewegung der Nematoden mit einer Kombination aus Zufallsbewegung und zyklischer Bewegung gut beschreiben lässt (siehe Abbildung 106). Die Periodendauer der zyklischen Bewegung ist dabei abhängig von der näheren Umgebung des Nematoden und beträgt in etwa 1 Sekunde. Für Zeitschritte größer oder gleich der Periodendauer kann die Bewegung der Nematoden mit einem Random walk beschrieben werden. Bei kürzeren Zeitabständen muss zur Beschreibung der Nematoden-Bewegung der periodische Anteil der Bewegung mit berücksichtigt werden.

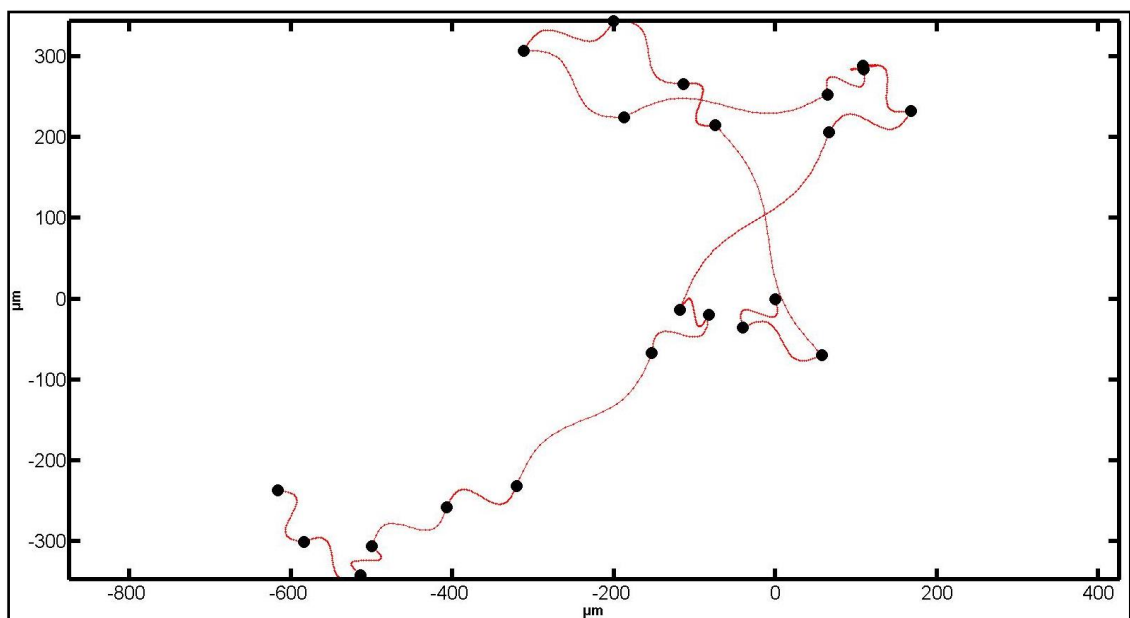


Abbildung 106: simulierte Tracking-Sequenz eines Nematoden in einer 0,5% -igen Agarose-Lösung. Die schwarzen Punkte sind die Start- bzw. Endpunkte der einzelnen Perioden. Die roten Nematoden-Mittelpunkte sind der eingefügte Bewegungszyklus während der Periode. Die Dauer der simulierten Nematoden-Bewegung in der obigen Abbildung ist 30 Sekunden und der zeitliche Abstand zwischen zwei (roten Mittel-) Punkten beträgt 1/30 Sekunden.

Mit dem von uns entwickelten Modell konnte auch eine Erklärung für die charakteristische Wellenform der mittleren quadratischen Verschiebung (in Abhängigkeit der Zeit) der Nematoden-

Bewegung gefunden werden. Diese spezielle Form (Überlagerung einer Geraden und einer wellenförmigen Funktion) ist das Resultat des oben beschriebenen Zusammenspiels zwischen der periodischen Bewegung (auf kurzen Zeitskalen) und der Zufallsbewegung (auf Zeitskalen größer als die Periodendauer). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Richtungsänderung der Nematoden bei ihrer Fortbewegung unabhängig von der Agarosekonzentration der Lösung bereits nach wenigen Sekunden (ca. 3 Sekunden) gleichverteilt ist. D. h. alle Winkel zwischen 0° und 180° treten mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auf.

Vergleich mit einem bereits vorhandenen Modell:

Ein gebräuchliches Modell zur Beschreibung der Bewegung von Nematoden ist das Phc-Modell²⁵ von Venkat Padmanabhan (Padmanabhan, et al., 2012). In diesem Modell wird die Bewegung der Nematoden auf Agarplatten stückweise mit harmonischen Funktionen beschrieben (siehe Abbildung 107). Dabei besitzen die einzelnen Funktionen unterschiedliche Amplituden, Wellenlängen und Phasenverschiebungen.

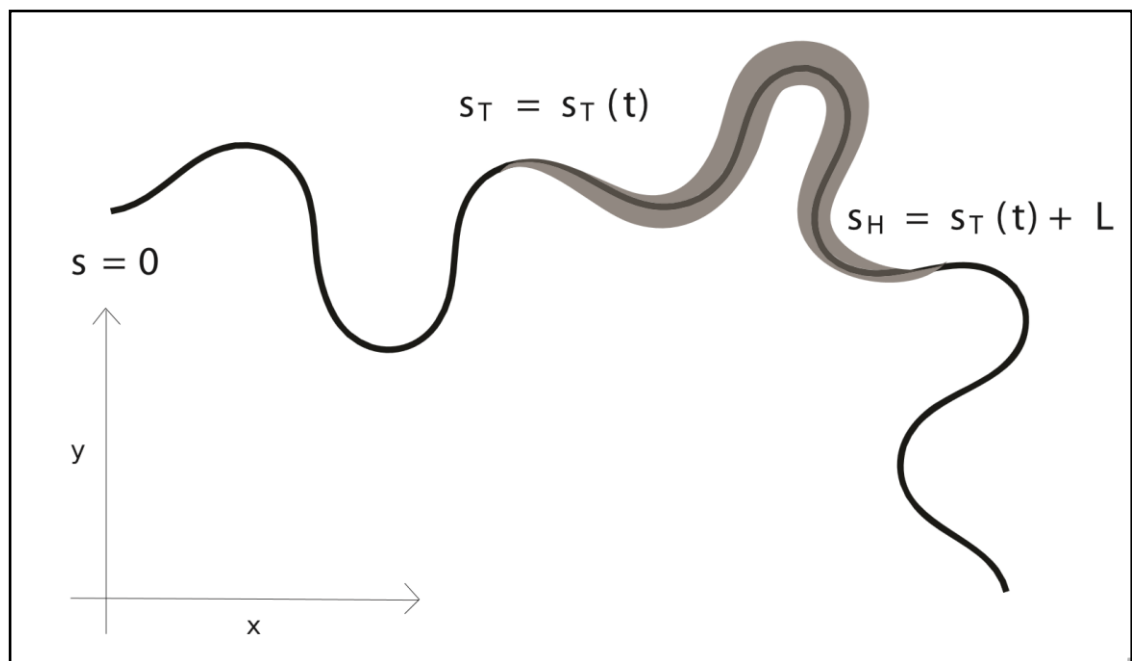


Abbildung 107: Beschreibung der Bahnkurven mit dem Phc-Modell von Padmanabhan. In diesem Modell ist der gesamte Körper des Nematoden ein Teilstück der Bahnkurve. Die komplette Bahnkurve wird stückweise mit harmonischen Funktionen beschrieben. Diese Funktionen haben unterschiedliche Amplituden, Wellenzahlen und Phasenverschiebungen. Mit diesem Verfahren lässt sich die Fortbewegung der Nematoden auf Agarplatten beschreiben.

Quelle: Padmanabhan, et al., 2012

Fazit:

Mit dem von uns entwickelten Modell lässt sich (im Gegensatz zum Phc-Modell) die Bewegung der Nematoden in unterschiedlich viskoelastischen Umgebungen beschreiben. Darüber hinaus ist in unserem Modell die Amplitude und die Phasenverschiebung der periodischen Auslenkung (Bewegungszyklus) konstant. Dies vereinfacht die Beschreibung der Nematoden-Bewegung. Vergleicht man die beiden Modelle miteinander, so ist es gerechtfertigt zu sagen: Mit dem von uns entwickelten Modell zur Beschreibung der Nematoden-Bewegung (Random walk in Kombination mit einer periodischen Auslenkung mit konstanter Amplitude und Phase) konnte ein neues (alternatives) Modell der Nematoden-Bewegung erstellt werden.

²⁵ Piecewise harmonic curvature-Modell

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Vorteile des verwendeten Software-Konzepts

Die gesamte Programmierung des Mikroskops wurde mit einem neuen Software-Konzept geschrieben, das aus einer Kombination von LabVIEW und Matlab besteht. Mit diesem Konzept ließen sich die Vorteile der beiden Programme (textbasierte und grafische Programmierung) kombinieren, d. h. die Programmierung des Durchlichtmikroskops konnte in einzelne Matlab-Skripte aufgeteilt werden, die mit einer LabVIEW erstellten Benutzeroberfläche bedient wurden. Mit den erstellten Benutzeroberflächen, der eigens entwickelten Methode des eingefrorenen Bilds und den zahlreichen Echtzeitplots der (selbst geschriebenen) Programme für die Aufnahme, Aufbereitung und Auswertung der Tracking-Daten ließen sich die idealen Einstellungen für die quantitative Analyse der Bewegungsdynamik schnell und einfach finden. Auch die Steuerung der beiden Hardware-Komponenten des Mikroskops (Kamera und Stage) konnte problemlos in die entwickelte Software mit eingebunden werden. Ein weiterer Vorzug unseres Software-Konzepts ist die einfache Erweiterbarkeit. Es können jederzeit ohne großen Aufwand neue Funktionen für das Mikroskop hinzugefügt werden (z. B. die Kalibrierung des Mikroskops). Dazu muss nur ein entsprechendes Matlab-Skript geschrieben und ein Bedienelement auf der LabVIEW-Benutzeroberfläche hinzugefügt werden.

7.2 Vor- und Nachteile der verwendeten Aufnahme-Verfahren

Aufnahme-Verfahren I:

Die beiden Vorteile des Aufnahme-Verfahren I sind, dass zum einen beliebig viele Nematoden gleichzeitig getrackt werden können. Dadurch ist es möglich, in kurzer Zeit Tracking-Daten von mehreren Nematoden zu erhalten. Zum anderen können mit diesem Verfahren beliebig lange Tracking-Sequenzen aufgenommen werden.

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch der eingeschränkte Messbereich von $2,0\text{ mm} \times 2,8\text{ mm}$. Auch werden bei diesem Verfahren nur geringe Tracking-Geschwindigkeiten erreicht, da jedes Bild nach seiner Aufnahme erst ausgewertet werden muss, bevor die Kamera eine neue Aufnahme machen kann.

Aufnahme-Verfahren II:

Der größte Vorteil dieses Aufnahme-Verfahrens ist sicherlich die hohe Aufnahme-Geschwindigkeit. Mit diesem Verfahren konnte die Bewegung der Nematoden mit 30 Bildern pro Sekunde aufgenommen werden (maximale Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera). Das Verfahren erlaubt es ebenfalls, mehrere Nematoden gleichzeitig zu tracken (vgl. Verfahren I)

Ein Nachteil des Aufnahme-Verfahrens II ist, dass die maximale Dauer einer Tracking-Sequenz 9,5 Sekunden beträgt. Auch bei diesem Verfahren ist die Größe des Messbereichs auf $2,0\text{ mm} \times 2,8\text{ mm}$ beschränkt.

Aufnahme-Verfahren III:

Der große Vorteil dieses Aufnahme-Verfahrens ist zweifellos, dass die Bewegung der Nematoden über lange Strecken getrackt werden kann. Dazu wird der ausgewählte Nematode durch das Fahren der Stage immer im Blickfeld der Kamera gehalten. Darüber hinaus gibt es für die Dauer einer Tracking-Sequenz bei diesem Verfahren (nahezu) keine Einschränkungen.

Bei diesem Aufnahme-Verfahren wird jedoch nur eine geringe Tracking-Geschwindigkeit erreicht, da jedes Bild erst am PC ausgewertet werden muss, bevor die Kamera eine neue Aufnahme machen kann. Aufgrund des großen Messbereichs wird zudem die Bildauswertung aufwendiger.

Fazit:

Durch die Verwendung von verschiedenen Aufnahme-Verfahren ließ sich die Hardware des Mikroskops optimal ausnutzen. Dadurch war es möglich, die Bewegung der Nematoden auf unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen zu messen. Dies erlaubte es uns, eine umfangreiche Analyse ihrer Bewegung in den viskoelastischen Umgebungen durchzuführen.

7.3 Zusammenfassung der quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik

Nachdem die Bewegung der Nematoden mit den verschiedenen Aufnahme-Verfahren gemessen wurde, wurden vor der quantitativen Analyse der Bewegungsdynamik die Tracking-Daten mit speziell entwickelten Programmen kontrolliert und aufbereitet. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur sauber aufgenommene Tracking-Sequenzen für die Untersuchung der Nematoden-Bewegung verwendet wurden. Für die Bewegungsanalyse wurden aus den Tracking-Daten aller Aufnahme-Verfahren

- die Verschiebung der Mittelpunkte,
- die Anomalie der Bewegung,
- die 'mean first passage time' und
- die mittlere Wegeffizienz

berechnet. Zusätzlich konnten aus den Tracking-Daten des Aufnahme-Verfahren II (Aufnahmegeschwindigkeit 30 s^{-1}) physikalische Größen bestimmt werden, die die Änderung der Körperform der Nematoden während der Bewegung beschreiben bzw. beinhalten. Diese sind:

- Periodendauer der Bewegung
- mittlere lokale Krümmung
- Amplitude der Bahnkurve (mittlere max. Auslenkung)

Die zentralen Ergebnisse waren, dass es bei Agarose-Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,4 Gew.-% einen optimal viskoelastischen Bereich für die Fortbewegung der Nematoden gibt. In diesem Bereich können sich die Nematoden am effizientesten fortbewegen, d. h. die Nematoden können ihre Umgebung am schnellsten erkunden. Ein weiteres Ergebnis unserer Analyse war, dass für lange Beobachtungszeiten (> 25 Sekunden) die Bewegung der Nematoden in allen viskoelastischen Umgebungen superdiffusiv ist. Darüber hinaus konnte noch gezeigt werden, dass die Nematoden nur in Lösungen mit Agarose-Konzentrationen größer oder gleich 0,3 Gew.-% in der Lage sind, längere Strecken auf direktem Weg zurückzulegen.

Auf Grundlage der erhaltenen Daten konnte ein neues Modell für die Bewegung der Nematoden durch unterschiedlich viskoelastische Umgebungen entwickelt werden. In diesem Modell wird die Bewegung der Nematoden mit einer Kombination aus Zufallsbewegung und zyklischer Bewegung beschrieben. Dabei hängt die Periodendauer der zyklischen Bewegung von der Viskoelastizität der Umgebung ab. Für Zeitschritte größer als die Periodendauer lässt sich die Bewegung der Nematoden mit einem Random walk beschreiben. Bei kürzeren Zeitabständen

muss der periodische Anteil der Nematoden-Bewegung mit berücksichtigt werden. Mit dem von uns entwickelten Modell lässt sich die Bewegung der Nematoden in unterschiedlich viskoelastischen Umgebungen auf allen Zeit- und Längenskalen beschreiben bzw. simulieren.

7.4 Ausblick

Mit der durchgeführten Analyse der Bewegungsdynamik von *C. elegans* konnte ein tiefer Einblick in die Bewegung der Nematoden durch unterschiedlich viskoelastische Umgebungen gegeben werden. Da jedoch die Fortbewegung der Nematoden von mehreren Faktoren abhängig ist, unter anderem auch von der Form und Zusammensetzung der Cuticula (z. B. führen Veränderungen an den Kollagen-Genen der Cuticula zu Mutationen von *C. elegans*, die sich wie ein „Korkenzieher“ fortbewegen), wäre es interessant zu untersuchen, in wieweit sich die erhaltenen Ergebnisse der durchgeführten Analyse der Bewegungsdynamik auf die verschiedenen Phänotypen von *C. elegans* übertragen lassen. Auch der (eventuelle) Einfluss eines zweiten Nematoden (bzw. mehrerer Nematoden) in der direkten Umgebung des beobachteten Nematoden auf die Fortbewegung wäre noch zu studieren (Gruppenverhalten). Da sich die verwendete Software einfach erweitern lässt, könnten diese Experimente am bereits gebauten Mikroskop mit nur kleinen Änderungen an den Programmen problemlos durchgeführt werden. Abschließend kann gesagt werden: Es gibt noch viel mehr Forschung auf dem Gebiet der Bewegungsdynamik von *C. elegans* zu machen, um weitere Erkenntnisse von der (äußerst komplexen) Fortbewegung der Nematoden zu erlangen.

Literaturverzeichnis

- Corsi, A., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology. *Wormbook*.
- de Chaumont, F., Dos-Santos Coura, R., Serreau, P., Cressant, A., Chabout, J., Granon, S., & Olivo-Marin, J.-C. (2012). computerized video analysis of social interactions in mice . *NATURE METHODS* .
- Fang-Yen, C., Raizen, D., & Trojanowski, N. (2016). Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system . *Scientific Reports*.
- Back, J.-H., Feng, Z., Cosman, P., Silver, J., & Schafer, W. R. (2002). Using machine vision to analyze and classify *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes quantitatively. *Journal of Neuroscience Methods*.
- Backholm, M., Kasper, A., Schulman, R., Ryu, W., & Dalnoki-Veress, K. (2015). The effects of viscosity on the undulatory swimming dynamics of *C. elegans*. *Physics of Fluids*.
- Baek, J.-H., Cosman, P., Feng, Z., Silver, J., & Schafer, W. (2002). Using machine vision to analyze and classify *Caenorhabditis elegans* behavioral phenotypes quantitatively. *Journal of Neuroscience Methods*.
- Barrière, A., & Félix, M.-A. (2014). Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook*.
- Bartumeus, F., Catalan, J., Fulco, U., & Viswanathan, G. (2002). Optimizing the encounter rate in biological interactions: Levy versus Brownian strategies. *Phys. Rev. Lett*.
- Bartumeus, F., da Luz, M., Viswanathan, G., & Catalan, J. (2005). ANIMAL SEARCH STRATEGIES: A QUANTITATIVE RANDOM-WALK ANALYSIS. *Ecology*.
- Berri, S., Boyle, J., Tassieri, M., Hope, I., & Cohen, N. (2009). Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait. *HFSP Journal*.
- Boyle, J., Berri, S., Tassieri, M., Hope, I., & Cohen, N. (2011). Gait Modulation in *C. Elegans*: It's Not a Choice, It's a Reflex! *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*.
- Butler, V., Branicky, R., Yemini, E., Liewald, J., Gottschalk, A., Kerr, R., . . . Schafer, W. (2014). A consistent muscle activation strategy underlies crawling and swimming in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of The Royal Society Interface*.
- Calhoun, A., Chalasani, S., & Sharpee, T. (2014). Maximally informative foraging by *Caenorhabditis elegans*. *eLife*.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., & Prasher, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for geneexpression. *Science*.
- Chisholm, A., & Hardin, J. (2005). Epidermal morphogenesis. *Wormbook*.

- Cleasby, I. R., Wakefield, E. D., Bearhop, S., Bodey, T. W., Votier, S. C., & Hamer, K. C. (2015). Three-dimensional tracking of a wide-ranging marine. *Journal of Applied Ecology*.
- Codling, E. A., Plank, M. J., & Simon, B. (2008). Random walk models in biology. *J. R. Soc. Interface*.
- Codling, E., Plank, M., & Benhamou, S. (2008). Random walk models in biology. *J. R. Soc. Interface*.
- Deepthi, R., Bhargavi, R., Jagadeesh, K., & Vijaya, M. (2010). RHEOMETRIC STUDIES ON AGAROSE GEL- A BRAIN MIMIC MATERIAL . *SAS Tech*.
- Feinberg, E., VanHoven, M., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R., Shen, K., & Bargmann, C. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron*.
- Ferrée, T., & Lockery, S. (1999). Computational rules for chemotaxis in the nematode *C. elegans*. *Journal of Computational Neuroscience*.
- Gagnon, D., Keim, N., & Arratia, P. (2014). Undulatory swimming in shear-thinning fluids: experiments with *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Fluid Mechanics*.
- Gagnon, D., Shen, X., & Arratia, P. (2013). Undulatory swimming in fluids with polymer networks.
- Geng, W., Cosman, P., Berry, C., Feng, Z., & Schafer, W. (2004). Automatic tracking, feature extraction and classification of *C. elegans* phenotypes. *IEEE Trans Biomed*.
- Gray, J., & Hancock, G. (1955). The Propulsion of Sea-Urchin Spermatozoa. *Experimental Biology*.
- Helms, S., Avery, L., Stephens, G., & Shimizu, T. (2015). Modeling the ballistic-to-diffusive transition in nematode motility reveals low-dimensional behavioral variation across species. *Quantitative Biology*.
- Holmes, P., Full, R., Koditschek, D., & Guckenheimer, J. (2006). The Dynamics of Legged Locomotion: Models, Analyses, and Challenges. *SIAM Review*.
- Hu, P. (2007). Dauer. *Wormbook*.
- Humphries, N., Queiroz, N., Dyer, J., Pade, N., Musyl, M., Schaefer, K., . . . Sims, D. (2010). Environmental context explains Lévy and Brownian movement patterns of marine predators. *Nature*.
- Kays, R., Crofoot, M. C., Jetz, W., & Wikelski, M. (2015). Terrestrial animal tracking as an eye on life and planet. *Ecology*.
- Kimble, J., & Hirsh, D. (1979). The Postembryonic Cell Lineages of the Hermaphrodite and Male Gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*.
- Leifer, A. M., Fang-Yen, C., Gershow, M., Alkema, M., & Samuel, A. D. (2011). Optogenetic manipulation of neural activity with high spatial resolution in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods*.
- Metzler, R., & Klafter, J. (2000). THE RANDOM WALK: A GUIDE TO ANOMALOUS DIFFUSION: A FRACTIONAL DYNAMICS APPROACH. *Physicists Reports*.

- Moerman, D., & Fire, A. (1997). Muscle: Structure, function and development. (D. Riddle, T. Blumenthal, B. Meyer, & J. Priess, Hrsg.) *C. elegans II*, S. 417–470.
- Padmanabhan, V., Khan, Z., Solomon, D., Armstrong, A., Rumbaugh, K., Vanapalli, S., & Blawdziewicz, J. (2012). Locomotion of. *PLOS ONE*.
- Raizen, D., Zimmermann, J., Maycock, M., Ta, U., You, Y., Sundaram, M., & Pack, A. (2008). Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*.
- Ramot, D., Johnson, B. E., Berry, Jr, T. L., Carnell, L., & Goodman, M. B. (2008). The Parallel Worm Tracker: A Platform for Measuring Average Speed and Drug-Induced Paralysis in Nematodes. *PLOS one*.
- Rihel, J., Prober, D. A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., . . . Schier, A. F. (2010). Zebrafish Behavioral Profiling Links Drugs to Biological Targets and Rest/Wake Regulation. *Science*.
- Riley, E., & Lauga, E. (2014). Enhanced active swimming in viscoelastic fluids. *EPL (Europhysics Letters)*.
- Shen, X., & Arratia, P. (2011). Undulatory Swimming in Viscoelastic Fluids. *Phys. Rev. Lett.*
- Sulston, J., & Horvitz, H. (1977). Post-embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* .
- Sulston, J., Albertson, D., & Thomson, J. (1980). The *Caenorhabditis elegans* Male: Postembryonic Development of Nongonadal Structures. *Developmental Biology* .
- Swierczek, N., Giles, A., Rankin, C., & Kerr, R. A. (2011). High-throughput behavioral analysis in *C. elegans*. *nature methods*.
- Sznitman, J., Purohit, P., Krajacic, P., Lamitina, T., & Arratia, P. (2010). Material properties of *Caenorhabditis elegans* swimming at low Reynolds number. *Biophysical journal*.
- Thomas, B., Etchberger, J., Hobert, O., & Howard, H. (2006). Reporter gene fusions. *WormBook*.
- Tsibidis, G. D., & Tavernarakis, N. (2007). Nemo: a computational tool for analyzing nematode locomotion. *BMC Neuroscience*.
- Vidal-Gadea, A., Topper, S., Young, L., Crisp, A., Kressin, L., Elbel, E., . . . Pierce-Shimomura, J. (2011). *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin . *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Viswanathan, G., Afanavis, V., Buldyrev, S., Havlin, S., da Luz, M., Raposo, E., & Stanley, H. (2001). Levy flights search patterns of biological organisms. *Physica*.
- Viswanathan, G., Afanasyev, V., Buldyrev, S., Murphy, E., Prince, P., & Stanley, H. (1996). Lévy flight search patterns of wandering albatrosses. *Nature*.
- Viswanathan, G., Buldyrev, S., Havlin, S., da Luz, M., Raposo, E., & Stanley, H. (1999). Optimizing the success of random searches. *Nature*.

- White, J., Southgate, E., Thomson, J., & Brenner, S. (1986). The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans* . *The Royal Society* .
- XU, Z., & Cheng, X. E. (2017). Zebrafish tracking using convolutional neural networks . *Scientific Reports*.

Anhang

technische Daten

Kamera

Hersteller:	Allied Vision Technologies GmbH Taschenweg 2a 07646 Stadtroda
Modell:	Manta G-201-30fps
Interface:	IEEE 802.3 1000BASE-T, IEEE 802.3af (PoE) optional
Auflösung:	1624 (H) × 1234 (V)
Sensor:	Sony ICX274
Sensortyp:	CCD Progressive
Sensorgröße:	Type 1/1.8
Zellgröße:	4.4 µm x 4.4 µm
Objektivanschluss:	C-Mount
Framerate:	30.0 fps
ADC:	12 Bit
Bildzwischenspeicher (RAM):	32 MByte

Output

Bit-Tiefe:	8-12 Bit
Mono Modi:	Mono8, Mono12, Mono12Packed
Farbmodi YUV:	YUV411Packed, YUV422Packed, YUV444Packed
Farbmodi RGB:	RGB8Packed, BGR8Packed
Raw Modi:	BayerRG8, BayerRG12Packed, BayerRG12

General purpose Inputs/Outputs (GPIOs)

Optogekoppelte I/Os:	2 inputs, 2 outputs
----------------------	---------------------

RS-232:

1

Betriebsbedingungen/Abmessungen

Betriebstemperatur: +5 °C to +45 °C ambient (without condensation)

Spannungsversorgung: 8 to 30 VDC; PoE

Leistungsaufnahme (@12 V): 4.6 W @ 12 VDC; 5.4 W PoE

Masse: 200 g; 210 g (PoE)

Abmessungen (L × B × H): 86.4mm × 44mm × 29mm (inkl. Anschlüsse)

Konformität: CE, RoHS, REACH, WEEE, FCC, ICES

optischer Aufbau

Hersteller: Thorlabs GmbH
Hans-Böckler-Straße 6
85221 Dachau

Bauteil: Adapter
Artikelnummer: MVLCMC
Beschreibung: C-Mount Adapter for 6.5X and
12X Zoom Lens Extension Tubes

Bauteil: 2x Zwischenring
Artikelnummer: MVL20A
Beschreibung: 2.00X Extension Tube for 6.5X and
12X Zoom Lenses

Bauteil: 6,5x Zoomobjektiv
Artikelnummer: MVL6X12Z
Beschreibung: 6.5X Zoom Lens with 12 mm
Fine Focus

Bauteil: 2x Vergrößerungslinse
Artikelnummer: MVL6X20L
Beschreibung: 2.0X Magnifying Lens Attachment for
6.5X Zoom Lens

Stage

Hersteller: Thorlabs GmbH
Hans-Böckler-Straße 6
85221 Dachau

Bauteil: Stage mit Controller und Stromversorgung
Artikelnummer: MTS50/M-Z8E
Anzahl: 2
Beschreibung: Metric-Tapped 50 mm Motorized Stage
with Controller and Power Supply

Bauteil: Bodenplatte
Artikelnummer: MTS50A-Z8
Anzahl: 1
Beschreibung: Base Plate for MTS50 Series Translation
Stages

Bauteil: Anschlussplatte
Artikelnummer: MTSA1/M
Anzahl: 1
Beschreibung: Adapter Plate with M6 and M4 Tapped
Holes for MTS25 and MTS50 Stages

Bauteil: XY-Verbindungsstück
Artikelnummer: MTS50B-Z8
Anzahl: 1
Beschreibung: XY Adapter Plate for MTS50 Series
Translation Stages

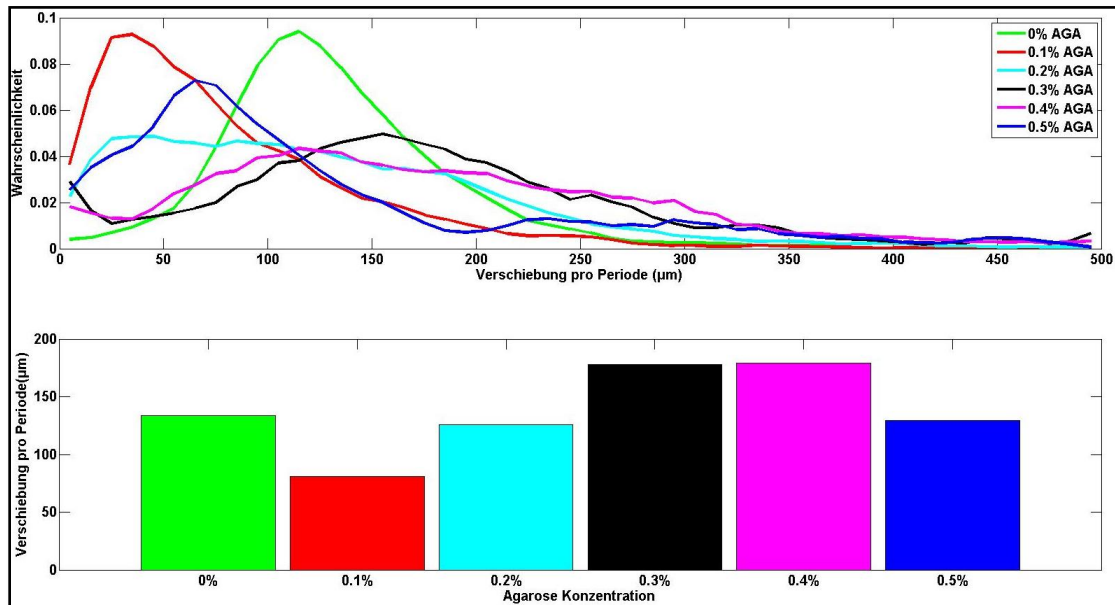
Bauteil: Controller Hub
Artikelnummer: TCH002
Anzahl: 1
Beschreibung: T-Cube Controller Hub and Power
Supply Unit

Lichtquelle

Beschreibung:	LED-Einbauleuchte mit 24LED-Dioden
Leistung:	1,65 Watt
Spannung:	24 Volt
Durchmesser:	65,5 mm
Tiefe:	10,5 mm

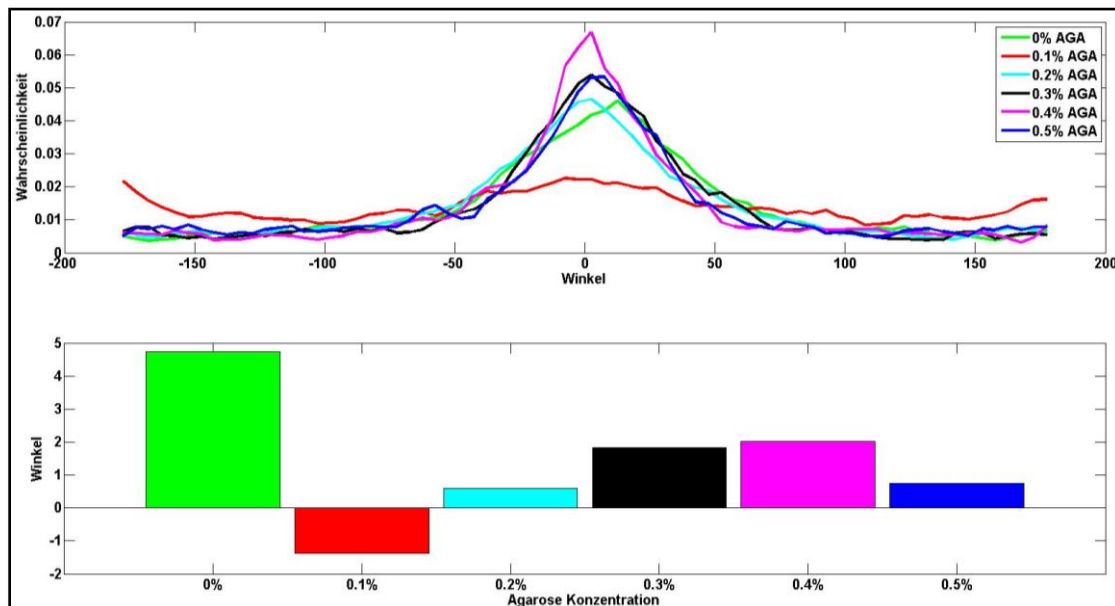
Verteilungen für die Simulation

Periodenlänge:



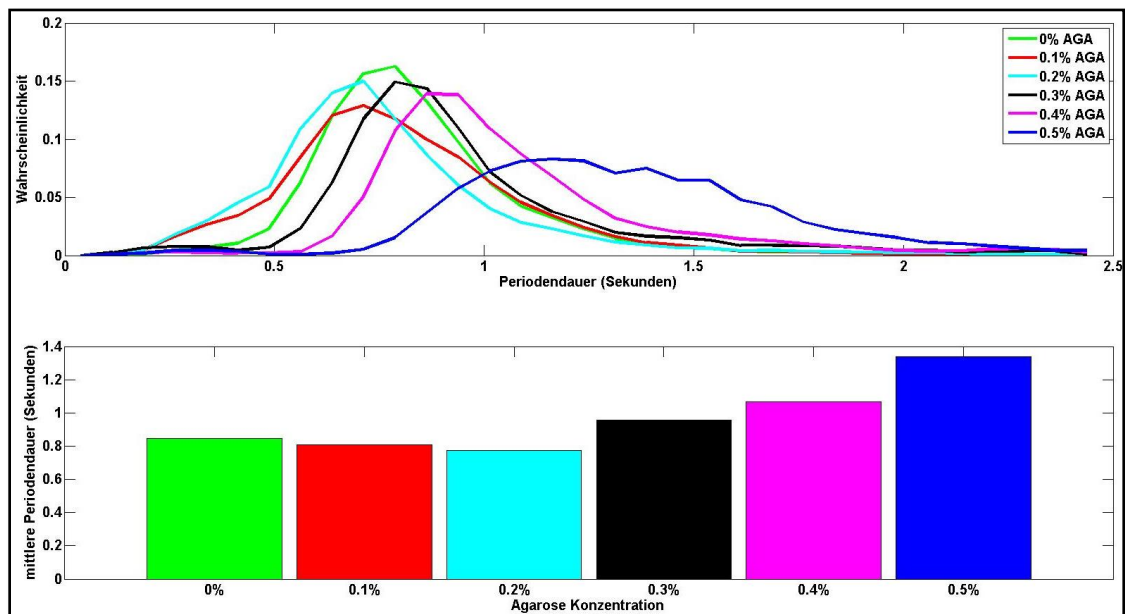
(oben) normierte Verteilung der Periodenlänge in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte

Periodenwinkel:



(oben) normierte Verteilung der Periodenwinkel in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte

Periodendauer:



(oben) normierte Verteilung der Periodendauern in den unterschiedlichen Agarose-Lösungen und (unten) die dazugehörigen Mittelwerte

Messprotokolle des komplexen Schubmoduls

1. Amplitudensweep bei einer Frequenz von 1 Hz

Agarose-Anteil der Umgebung: 0,2 %

Messprotokoll Teil 1

```
***** :
Daten-Dateiname : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-as_0.000015-15_1hz_01.dow
Erstelldatum : Friday, June 19, 2015 14:07:01
Version : 10

Titel :
Messung vom : Friday, June 19, 2015 14:05:32
Test-Zeit : 1 169 5 115 5 19 14 5 32

Parameter-Datei Referenz: {E86E405D-A4D8-4AAA-8AF9-C9395EC82A98}
Parameter-Datei : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-as_0.000015-15_1hz_01.pow
Parameter Beschreibung:
Benutzer-Identifikation:
Messgerät=CVO : 4

Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Benutzer-Variable Wert: -3.000e+36

Ms Title : PP 20
Ms C1 : 4.774650e+05
Ms C2 : 7.500000e+00
Ms C3 : 1.000
Ms C4 : 2.200000e-07
Ms C5 : 0.000
Ms Gap : 0.500

Proben-Ref. :
N Bemerkungen : 0
Anzahl der Variablen: 11
Variablen : 48 52 27 2 36 35 34 8 14 3 24

Oszillations-Daten-Version: 4
Oszillations-Modus : 0
ASTM : AUS

Num. Test Lauf : 1
Temperaturen : 1
Temp. Rampen : 1
Versch. Daten Pkte. : 20
Letzter Test Lauf : 1
Vorrausg. Temperatur: 1
Vorrausg. Temp.-Rampe: 1
Letzter Daten Pkt : 20

Test-Lauf[1] :
Temperatur[1] : 20.0
Temp. Lauf[1] :
Letzter Daten-Punkt : 19
Start Test Zeit : 10.0315
```

Messprotokoll Teil 2

Kopfzeile[1] Kopfzeile[2]	:	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Frequenz (Hz)	Phasenwinkel (°)	Phasenwinkel (Pa)	Komp. Schubmodul (Pa)	Elastischer Modul (Pa)	Viskoser Modul (Pa)	Komplexe Viskosität	Schubspannung	Deformation	Normalkraft	Anmerkung
Daten Pkt[1]	:	3.029	20.0	1.0000e+00	79.44	3.0867e+03	5.6577e+02	3.0344e+03	1.6204e-02	5.2560e-06	3.800011e-02	3		
Daten Pkt[2]	:	6.136	20.0	1.0000e+00	63.93	2.9036e+03	1.2760e+03	2.6083e+03	4.6213e+02	1.4481e-05	5.500031e-02	4	3	
Daten Pkt[3]	:	9.259	20.0	1.0000e+00	8.17	1.0494e+04	1.0387e+04	1.4911e+03	1.9929e-02	1.8953e-06	3.900003e-02	4	3	
Daten Pkt[4]	:	12.387	20.0	1.0000e+00	69.28	6.7610e+01	2.3925e+01	6.3235e+01	1.9444e-03	3.0723e-05	1.700020e-02	4		
Daten Pkt[5]	:	15.509	20.0	1.0000e+00	63.36	1.1225e+03	5.0365e+02	1.0042e+03	2.0883e-02	1.8429e-05	2.099991e-02			
Daten Pkt[6]	:	18.635	20.0	1.0000e+00	87.13	2.9815e+02	1.4919e+01	2.9777e+02	1.5969e-02	5.3234e-05	8.599997e-02	4		
Daten Pkt[7]	:	21.763	20.0	1.0000e+00	70.26	4.6478e+01	1.5698e+01	4.3740e+01	1.4454e-03	2.5207e-05	7.399980e-02			
Daten Pkt[8]	:	24.886	20.0	1.0000e+00	68.17	3.0718e+02	1.1421e+02	2.8516e+02	6.6024e-03	2.2016e-05	2.600002e-02			
Daten Pkt[9]	:	28.009	20.0	1.0000e+00	24.01	2.6529e+02	2.4234e+02	1.0793e+02	6.3328e-03	2.2224e-05	8.699989e-02	4		
Daten Pkt[10]	:	31.135	20.0	1.0000e+00	83.84	1.0487e+02	1.1244e+01	1.0426e+02	4.8998e-03	4.6774e-05	6.400013e-02	4		
Daten Pkt[11]	:	34.267	20.0	1.0000e+00	8.42	2.0090e+00	1.9873e+00	2.9401e-01	3.8996e-01	2.0111e-02	4.699993e-02	4		
Daten Pkt[12]	:	37.388	20.0	1.0000e+00	8.75	4.9793e+00	4.9213e+00	7.5744e-01	7.2842e-01	4.4223e-02	4.900026e-02	4		
Daten Pkt[13]	:	40.507	20.0	1.0000e+00	4.85	5.2662e+00	5.2474e+00	4.4527e-01	1.4864e+00	9.2126e-02	0.1	4		
Daten Pkt[14]	:	43.633	20.0	1.0000e+00	7.55	5.2297e+00	5.1844e+00	6.8684e-01	3.0938e+00	1.9091e-01	-1.999855e-03	4		
Daten Pkt[15]	:	46.763	20.0	1.0000e+00	20.36	2.1054e+00	1.9738e+00	7.3255e-01	7.6771e+00	3.9541e-01	7.999897e-03	4		
Daten Pkt[16]	:	49.887	20.0	1.0000e+00	11.73	1.1166e+00	1.0933e+00	2.2706e-01	1.5369e+01	7.5772e-01	6.800032e-02	4		
Daten Pkt[17]	:	53.007	20.0	1.0000e+00	33.52	7.9537e-01	6.6380e-01	4.3925e-01	3.1225e+01	1.5072e+00	5.900002e-02	4		
Daten Pkt[18]	:	56.134	20.0	1.0000e+00	81.19	1.8630e-01	2.8547e-02	1.8410e-01	6.1967e+01	2.8950e+00	9.999275e-04	4		
Daten Pkt[19]	:	59.262	20.0	1.0000e+00	29.84	6.8866e-01	5.9733e-01	3.4271e-01	1.5058e+02	7.2460e+00	3.500032e-02	4		
Daten Pkt[20]	:	62.382	20.0	1.0000e+00	50.85	1.4226e-01	8.9819e-02	1.1032e-01	3.1895e+02	1.4984e+01	7.299995e-02	4		
W Tabelle	:	2												
Anmerkung[1]	:	3												
Anmerkung[2]	:	4												
***** EOF *****	:													

Deformation sehr klein - Grenzbereich des Winkelaufnehmers ist erreicht.
Roh-Phasenwinkel zu groß.

2. Amplitudensweep bei einer Frequenz von 10 Hz

Agarose-Anteil der Umgebung: 0,2 %

Messprotokoll Teil 1

```
***** :
Daten-Dateiname : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-as_0.000015-15_10hz_01.dow
Erstelldatum : Friday, June 19, 2015 14:05:18
Version : 10

Titel :
Messung vom : Friday, June 19, 2015 14:03:53
Test-Zeit : 1 169 5 115 5 19 14 3 53

Parameter-Datei Referenz: {B8881A7C-DE52-4ED9-9648-2F9D3F19301F}
Parameter-Datei : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-as_0.000015-15_10hz_01.pow
Parameter Beschreibung:
Benutzer-Identifikation:
Messgerät=CV0 : 4

Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Benutzer-Variable Wert: -3.000e+36

Ms Title : PP 20
Ms C1 : 4.774650e+05
Ms C2 : 7.500000e+00
Ms C3 : 1.000
Ms C4 : 2.200000e-07
Ms C5 : 0.000
Ms Gap : 0.500

Proben-Ref. :
N Bemerkungen : 0
Anzahl der Variablen: 11
Variablen : 48 52 27 2 36 35 34 8 14 3 24

Oszillations-Daten-Version: 4
Oszillations-Modus : 0
ASTM : AUS

Num. Test Lauf : 1
Temperaturen : 1
Temp. Rampen : 1
Versch. Daten Pkte. : 20
Letzter Test Lauf : 1
Vorrausg. Temperatur: 1
Vorrausg. Temp.-Rampe: 1
Letzter Daten Pkt : 20

Test-Lauf[1] :
Temperatur[1] : 20.0
Temp. Lauf[1] :
Letzter Daten-Punkt : 19
Start Test Zeit : 10.0361
```

Messprotokoll Teil 2

Kopfzeile[1] Kopfzeile[2]	:	:	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Frequenz (Hz)	Phasenwinkel (°)	Komp. Schubmodul (Pa)	Elastischer Modul (Pa)	Viskoser Modul (Pa)	Komplexe Viskosität	Schubspannung	Deformation	Normalkraft	Anmerkung
Daten Pkt[1]	:	:	2.274	20.0	1.0000e+01	57.67	2.4314e+03	3.8419e+03	7.2361e+01	2.7488e-01	4.6047e-05	-0.2	4	
Daten Pkt[2]	:	:	4.887	20.0	1.0000e+01	4.78	2.5130e+03	2.1022e+02	4.0135e+01	4.0065e-02	9.3116e-05	-0.3	4	
Daten Pkt[3]	:	:	7.383	20.0	1.0000e+01	36.69	1.2087e+03	9.0065e+02	2.3990e+01	1.2697e-01	9.8139e-05	-0.4		
Daten Pkt[4]	:	:	10.000	20.0	1.0000e+01	73.90	1.5574e+03	1.4915e+03	2.4707e+01	1.1082e-01	4.8887e-05	-0.3	4	
Daten Pkt[5]	:	:	12.754	20.0	1.0000e+01	35.09	1.3545e+03	7.7870e+02	2.1558e+01	1.4609e-01	1.1319e-04	-0.3	4	
Daten Pkt[6]	:	:	15.191	20.0	1.0000e+01	81.13	2.2355e+03	2.2117e+03	3.5677e+01	1.8195e-01	6.3913e-05	-0.4		
Daten Pkt[7]	:	:	17.814	20.0	1.0000e+01	51.89	1.2141e+03	9.5535e+02	1.9323e+01	1.0088e-01	5.9387e-05	-0.3	4	
Daten Pkt[8]	:	:	20.456	20.0	1.0000e+01	20.75	9.5972e+03	3.3995e+03	1.5274e+02	1.6669e-01	1.4344e-05	-0.3	4 3	
Daten Pkt[9]	:	:	23.222	20.0	1.0000e+01	8.64	1.5511e+03	2.3295e+02	2.4687e+01	6.4282e-02	9.9300e-05	-0.4		
Daten Pkt[10]	:	:	26.023	20.0	1.0000e+01	0.54	2.3890e+03	2.2447e+01	3.7959e+01	2.8392e-02	1.1430e-04	-0.2		
Daten Pkt[11]	:	:	28.720	20.0	1.0000e+01	74.96	2.0179e+03	1.9488e+03	3.2116e+01	2.7610e-01	1.0912e-04	-0.3	4	
Daten Pkt[12]	:	:	31.272	20.0	1.0000e+01	38.73	1.3938e+03	8.7203e+02	2.2182e+01	1.1617e-01	8.5102e-05	-0.4		
Daten Pkt[13]	:	:	33.921	20.0	1.0000e+01	8.42	6.1863e+03	9.0613e+02	9.8458e+01	6.3599e-02	1.5573e-05	-0.3	4	
Daten Pkt[14]	:	:	36.580	20.0	1.0000e+01	78.48	1.9916e+03	1.9515e+03	3.1697e+01	3.7808e-01	1.4461e-04	-0.3	4	
Daten Pkt[15]	:	:	39.175	20.0	1.0000e+01	23.09	1.9113e+03	1.7582e+03	3.0419e+01	7.9787e-02	9.4979e-05	-0.5	4	
Daten Pkt[16]	:	:	41.775	20.0	1.0000e+01	14.32	2.2405e+03	5.5411e+02	3.5658e+01	2.8556e-02	5.1442e-05	-0.4	4	
Daten Pkt[17]	:	:	44.425	20.0	1.0000e+01	20.78	4.6896e+03	1.6641e+03	7.4638e+01	7.4963e-02	2.6810e-05	-0.3		
Daten Pkt[18]	:	:	47.074	20.0	1.0000e+01	83.24	3.1555e+03	3.1366e+03	5.0270e+01	2.6382e-01	6.5677e-05	-0.4	4	
Daten Pkt[19]	:	:	49.735	20.0	1.0000e+01	66.50	2.2112e+03	2.0279e+03	3.5192e+01	1.9060e-01	7.9903e-05	-0.4	4	
Daten Pkt[20]	:	:	52.248	20.0	1.0000e+01	56.68	5.6835e+02	4.7490e+02	9.0456e+00	1.9820e-01	7.9427e-05	-0.3	4	
II Tabelle	:	:												
Anmerkung[1]	:	:												
Anmerkung[2]	:	:												
***** EOF *****	:	:												

2
3 Deformation sehr klein - Grenzbereich des Winkelaufnehmers ist erreicht.
4 Roh-Phasenwinkel zu groß.

3. Frequenzsweep zwischen 0,01 Hz und 10 Hz

Agarose-Anteil der Umgebung: 0,2 %

Messprotokoll Teil 1

```
***** :
Daten-Dateiname : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-fs_0.01-10hz_0.002_01.dow
Erstelldatum : Friday, June 19, 2015 14:22:29
Version : 10

Titel :
Messung vom : Friday, June 19, 2015 14:07:22
Test-Zeit : 1 169 5 115 5 19 14 7 22

Parameter-Datei Referenz: {24C2E1A5-6732-4AB7-AF14-8EA42724854E}
Parameter-Datei : c:\dokumente und einstellungen\franziska\desktop\messungen rheometer a\ep1\carsten ii\02_20c-fs_0.01-10hz_0.002_01.pow
Parameter Beschreibung:
Benutzer-Identifikation:
Messgerät=CVO : 4

Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Beschreibung(Symbol):
Benutzer-Variable Wert: -3.000e+36

Ms Title : PP 20
Ms C1 : 4.774650e+05
Ms C2 : 7.500000e+00
Ms C3 : 1.000
Ms C4 : 2.200000e-07
Ms C5 : 0.000
Ms Gap : 0.500

Proben-Ref. :
N Bemerkungen : 0
Anzahl der Variablen: 11
Variablen : 48 52 27 2 36 35 34 8 14 3 24

Oszillations-Daten-Version: 4
Oszillations-Modus : 0
ASTM : AUS

Num. Test Lauf : 1
Temperaturen : 1
Temp. Rampen : 1
Versch. Daten Pkte. : 50
Letzter Test Lauf : 1
Vorrausg. Temperatur: 1
Vorrausg. Temp.-Rampe: 1
Letzter Daten Pkt : 50

Test-Lauf[1] :
Temperatur[1] : 20.0
Temp. Lauf[1] :
Letzter Daten-Punkt : 49
Start Test Zeit : 10.0373
```

Messprotokoll Teil 2

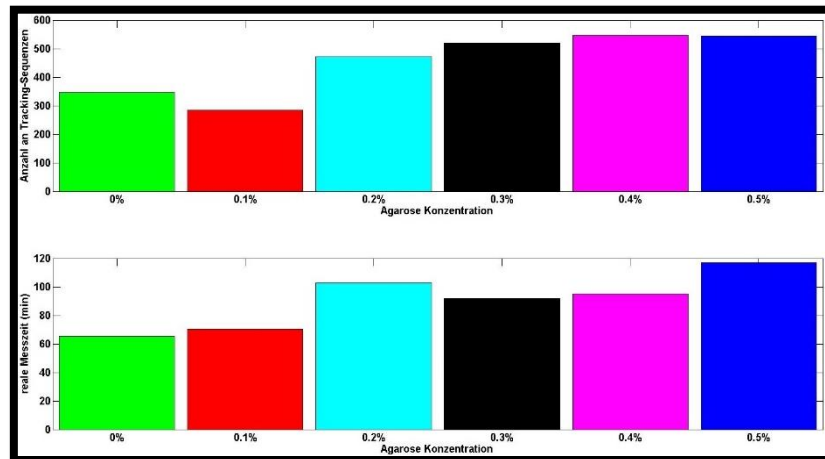
	Zeit	Temperatur	Frequenz	Phasenwinkel	Komp. Schubmodul	Elastischer Modul	Viskoser Modul	Komplexe Viskosität	Deformation	Normalkraft	Anmerkung		
	(s)	(°C)	(Hz)	(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)					
Kopfzeile[1]	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
Kopfzeile[2]	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
Daten Pkt[1]	:	101.995	20.0	1.0000e-02	36.27	3.3008e+00	2.6613e+00	1.9528e+00	5.2535e+01	6.3320e-03	1.9193e-03	-0.1	4
Daten Pkt[2]	:	190.922	20.0	1.1514e-02	46.28	2.3210e+00	9.1301e-01	9.5471e-01	1.8268e+01	2.5969e-02	1.9687e-03	-6.799984e-02	4
Daten Pkt[3]	:	268.492	20.0	1.3237e-02	55.47	2.3766e+00	1.3306e+00	1.9341e-01	2.8160e+01	4.7932e-03	2.0436e-03	-5.599976e-02	4
Daten Pkt[4]	:	335.125	20.0	1.5264e-02	4.27	1.6615e+00	1.6569e+00	1.7324e+01	3.4697e-03	2.0820e-03	2.0206e-03	-8.599997e-02	4
Daten Pkt[5]	:	395.139	20.0	1.7575e-02	71.99	2.9928e-01	9.2544e-02	2.8461e-01	2.7102e+00	6.1800e-04	2.0506e-03	-7.999997e-02	4
Daten Pkt[6]	:	446.701	20.0	2.0236e-02	16.84	5.8410e+00	5.5904e+00	1.6925e+00	4.5939e+01	1.1401e-02	1.9546e-03	-9.699965e-02	
Daten Pkt[7]	:	491.698	20.0	2.3300e-02	16.15	6.7578e+00	6.2990e+00	1.8243e+00	4.4796e+01	1.3064e-02	1.9956e-03	-0.1	
Daten Pkt[8]	:	531.057	20.0	2.6827e-02	10.02	3.3671e+00	3.7057e+00	6.5903e-01	2.2325e+01	7.5657e-03	2.0186e-03	-0.1	4
Daten Pkt[9]	:	595.795	20.0	3.0888e-02	18.76	4.2882e+00	4.0604e+00	1.3790e+00	8.6674e-03	2.0304e-03	2.0019e-03	-7.900000e-02	
Daten Pkt[10]	:	595.795	20.0	3.0888e-02	17.80	2.0251e+00	1.9282e+00	6.1890e-01	9.0623e+00	4.0024e-03	2.0019e-03	-7.900000e-02	
Daten Pkt[11]	:	622.335	20.0	4.0949e-02	25.04	2.5150e+00	2.2787e+00	1.0643e+00	9.7748e+00	5.1245e-03	2.0642e-03	-0.1	4
Daten Pkt[12]	:	665.636	20.0	4.7109e-02	15.66	4.9955e+00	4.8111e+00	1.3486e+00	1.6866e+01	9.9734e-03	2.0044e-03	-0.1	4
Daten Pkt[13]	:	666.141	20.0	5.4287e-02	52.00	6.6701e-01	4.1666e-01	5.2560e-01	1.9555e+00	1.2670e-03	2.0105e-03	-0.1	
Daten Pkt[14]	:	684.221	20.0	6.2506e-02	9.42	4.0138e+00	3.9597e+00	6.5671e-01	1.0220e+01	7.8913e-03	2.0073e-03	-0.2	4
Daten Pkt[15]	:	700.254	20.0	7.1909e-02	3.63	3.3342e+00	3.3752e+00	2.1138e-01	2.7246e+00	6.6294e-03	2.0564e-03	-0.2	4
Daten Pkt[16]	:	714.421	20.0	8.2864e-02	20.41	6.6081e+00	6.1931e+00	2.3040e+00	1.2692e-01	1.2754e-02	1.9710e-03	-9.200001e-02	
Daten Pkt[17]	:	727.019	20.0	9.5410e-02	80.41	1.3205e+01	1.3747e+00	2.0284e-01	2.2028e+01	2.7149e-02	2.0589e-03	-3.399992e-02	4
Daten Pkt[18]	:	738.205	20.0	1.0995e-01	4.36	1.3120e+00	1.3082e+00	9.9732e-01	1.9088e+00	2.1446e-03	2.0328e-03	-0.2	4
Daten Pkt[19]	:	748.181	20.0	1.2649e-01	11.15	3.8678e+00	3.7948e+00	7.4806e-01	4.8668e+00	6.7770e-03	1.9041e-03	-8.299971e-02	
Daten Pkt[20]	:	757.154	20.0	1.4593e-01	41.42	2.2796e+00	1.7095e+00	2.4913e+00	2.8218e-03	2.8218e-03	1.4377e-03	-0.2	4
Daten Pkt[21]	:	765.251	20.0	1.6768e-01	12.97	5.3646e+00	5.2332e+00	1.1800e+00	5.0918e+00	6.4398e-03	1.3472e-03	-8.500004e-02	
Daten Pkt[22]	:	772.526	20.0	1.9307e-01	29.59	5.9620e+00	5.2019e+00	2.9537e+00	4.9312e+00	7.0860e-03	1.3360e-03	-0.2	
Daten Pkt[23]	:	779.156	20.0	2.2230e-01	8.45	3.4455e+00	3.4081e+00	5.0659e-01	2.4668e+00	3.1401e-03	1.3053e-03	-0.1	
Daten Pkt[24]	:	785.189	20.0	2.5959e-01	4.56	4.1574e+00	4.1442e+00	3.3080e-01	2.5851e+00	3.6598e-03	1.3242e-03	-9.200001e-02	
Daten Pkt[25]	:	790.672	20.0	2.9471e-01	21.92	3.4364e+00	3.1878e+00	1.2831e+00	1.8558e+00	2.5514e-03	1.3799e-03	-7.099962e-02	4
Daten Pkt[26]	:	795.726	20.0	3.3932e-01	0.64	6.7520e+00	6.7515e+00	7.5787e-02	3.1669e+00	6.2477e-03	1.4560e-03	-8.099983e-02	
Daten Pkt[27]	:	800.410	20.0	3.9096e-01	55.91	2.5186e+00	2.1116e+00	2.0859e+00	3.9959e-03	2.6277e-03	1.4328e-03	-0.1	4
Daten Pkt[28]	:	804.768	20.0	4.4984e-01	3.15	6.1172e+00	6.1080e+00	3.3591e-01	2.1643e+00	2.6468e-03	1.4592e-03	-8.999968e-02	
Daten Pkt[29]	:	808.774	20.0	5.1795e-01	17.89	3.9195e+00	3.7299e+00	1.2044e+00	3.7299e+00	3.7064e-03	1.5851e-03	-8.500004e-02	4
Daten Pkt[30]	:	812.611	20.0	5.9636e-01	4.07	7.3434e+00	7.3249e+00	5.2156e-01	1.9598e+00	8.7908e-04	1.4883e-03	-0.2	4
Daten Pkt[31]	:	816.186	20.0	6.8656e-01	18.81	5.2122e+00	4.9339e+00	2.081e+00	1.2081e+00	8.2388e-03	1.5224e-03	-0.2	
Daten Pkt[32]	:	819.570	20.0	7.9060e-01	15.15	6.6728e+00	6.4409e+00	1.7437e+00	1.3435e+00	1.0843e-02	1.5194e-03	-0.1	4
Daten Pkt[33]	:	822.788	20.0	9.1030e-01	1.47	6.3011e+00	6.2990e+00	1.6119e-01	1.1017e+00	1.6869e-02	1.4779e-03	-0.2	4
Daten Pkt[34]	:	825.887	20.0	1.0451e+00	28.65	3.1028e+00	2.7228e+00	4.7115e-01	3.1937e-02	1.5345e-03	1.5193e-03	-0.2	4
Daten Pkt[35]	:	829.007	20.0	1.2068e+00	34.29	2.4777e+00	2.0471e+01	1.3957e-01	3.2676e+00	2.7828e-02	1.5846e-03	-0.2	4
Daten Pkt[36]	:	831.989	20.0	1.3895e+00	3.35	4.3510e+00	4.3436e+00	2.4434e-01	4.9837e-01	5.2515e-02	1.4221e-03	-0.2	4
Daten Pkt[37]	:	835.101	20.0	1.5999e+00	16.71	2.7816e+01	2.6642e+01	7.9666e+00	2.7672e+00	4.7755e-02	1.6362e-03	-0.2	
Daten Pkt[38]	:	838.151	20.0	1.8421e+00	33.90	1.4935e+01	1.2288e+01	8.3245e+00	1.2895e+00	9.4281e-02	1.5280e-03	-0.2	4
Daten Pkt[39]	:	844.110	20.0	2.1210e+00	21.36	2.0461e+01	1.9055e+01	7.4521e+00	1.5554e+00	1.9009e-01	1.6465e-03	-0.1	4
Daten Pkt[40]	:	844.136	20.0	2.4421e+00	72.48	1.7020e+01	5.1233e+01	1.6231e+01	1.1093e+00	2.0290e-01	1.5193e-03	-0.2	4
Daten Pkt[41]	:	847.712	20.0	2.8118e+00	43.69	1.9891e+01	1.4384e+01	1.3738e+01	1.2259e+00	2.4020e-01	1.5475e-03	-3.499983e-02	4
Daten Pkt[42]	:	850.750	20.0	3.2375e+00	47.54	2.4588e+01	1.6600e+01	1.8139e+01	1.2088e+00	3.5761e-01	1.7174e-03	-0.2	4
Daten Pkt[43]	:	853.725	20.0	3.7276e+00	75.07	3.7427e+01	9.6417e+00	3.6163e+01	1.5980e+00	4.9365e-01	1.5987e-03	-9.299994e-02	4
Daten Pkt[44]	:	856.703	20.0	4.2919e+00	55.92	1.9062e+01	1.0682e+01	1.5788e+01	7.0686e-01	6.6096e-01	1.7344e-03	-0.2	4
Daten Pkt[45]	:	860.090	20.0	4.9417e+00	18.75	2.1444e+01	2.0306e+01	1.6822e+00	6.9062e-01	8.2905e-01	1.6325e-03	-0.1	4
Daten Pkt[46]	:	863.311	20.0	5.6899e+00	72.71	6.2191e+01	1.8484e+01	5.9381e+01	1.7396e+00	1.1322e+00	1.6745e-03	-4.500008e-02	4
Daten Pkt[47]	:	866.238	20.0	6.5313e+00	85.34	6.2239e+01	5.0568e+00	3.2683e+01	1.5120e+00	1.6708e+00	1.8270e-03	-2.999973e-02	4
Daten Pkt[48]	:	869.227	20.0	7.5431e+00	36.66	5.3075e+01	4.2579e+01	3.1686e+01	1.1199e+00	1.8552e-03	1.7337e-03	-0.1	4
Daten Pkt[49]	:	872.308	20.0	8.6851e+00	12.03	7.2357e+01	7.0768e+01	1.5079e+01	1.3259e+00	2.6729e+00	1.7337e-03	-0.2	4
Daten Pkt[50]	:	875.279	20.0	1.0000e+01	6.71	3.0207e+01	3.0000e+01	3.5274e+00	4.8076e-01	3.7359e+00	1.7727e-03	-0.2	4

Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeiten

Aufnahme-Verfahren 1

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anzahl an Sequenzen: [#]	347	284	471	520	546	545
reale Messzeit: [min]	65	70	103	92	95	117

Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeit pro Agarose-Lösung. Die reale Messzeit ist die Zeit, in der sich ein Nematode im Blickfeld der Kamera befand.

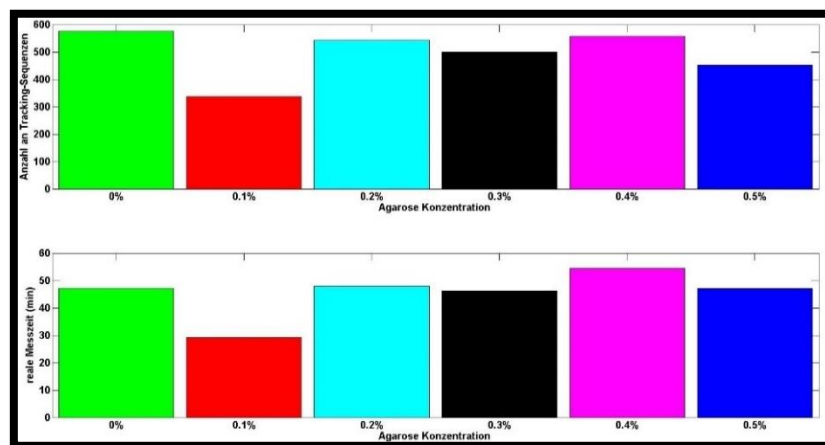


(oben) Anzahl an Tracking-Sequenzen und (unten) reale Messzeiten des Aufnahme-Verfahrens I (in den unterschiedlichen Umgebungen). Die reale Messzeit ist die Zeit, in der sich ein Nematode im Blickfeld der Kamera befand.

Aufnahme-Verfahren II

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anzahl an Sequenzen: [#]	575	337	542	500	558	451
reale Messzeit: [min]	47	29	48	46	54	47

Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeit pro Agarose-Lösung.

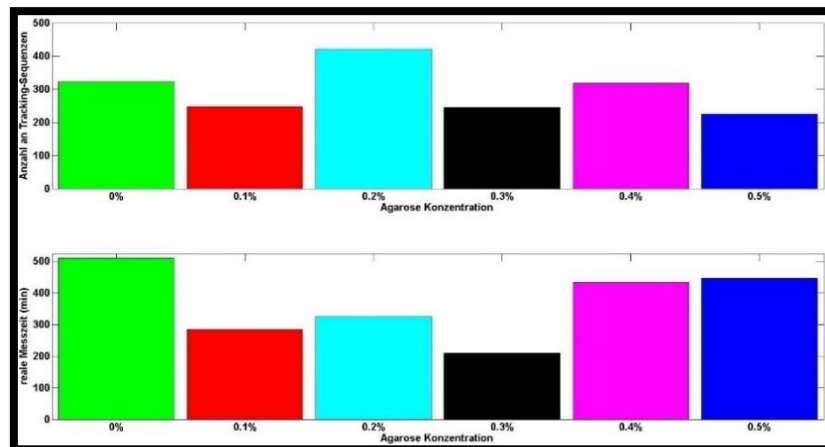


(oben) Anzahl an Tracking-Sequenzen und (unten) reale Messzeiten des Aufnahme-Verfahrens II (in den unterschiedlichen Umgebungen).

Aufnahme-Verfahren III

Agarose-Konzentration: [%]	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Anzahl an Sequenzen: [#]	322	248	420	245	317	225
reale Messzeit: [min]	510	285	326	209	433	446

Anzahl an Tracking-Sequenzen und reale Messzeit pro Agarose-Lösung



(oben) Anzahl an Tracking-Sequenzen und (unten) reale Messzeiten des Aufnahme-Verfahren III (in den unterschiedlichen Umgebungen).

Matlab-Skripte

Aufnahme-Verfahren I

```
1 -   |start(vid)
2 -   data = getdata(vid);
3 -   stop(vid)
4 -   T_1 = toc;
5
6 -   make_pic = 1;
7
8 -   if fr_num == 0
9 -       Pics = {[]};
10 -   end
11
12 -   fr_num = fr_num +1;
13 -   img = double(data);
14 -   thres_img = img <= th_s;
15 -   border_img = imclearborder(thres_img);
16
17 -   CC = bwconncomp(border_img);
18 -   stats = regionprops(CC, 'Area');
19 -   f_s = [stats.Area];
20 -   u = find(f_s >= m_size_s);
21
22 -   centroids = zeros(2,1); contour = {[]}; w_size = zeros(1,1);
23
24 -   if ~isempty(u)
25 -       index = index+1;
26 -       for j = 1:size(u,2)
27 -           cur_img = ismember(labelmatrix(CC),u(j));
28 -           Cen = regionprops(cur_img, 'centroid');
29 -           centroids(:,j) = Cen.Centroid';
30
31 -           s = size(cur_img);
32 -           for row = 1:50:s(1)
33 -               for col = 1:s(2)
34 -                   if cur_img(row,col)
35 -                       break
36 -                   end
37 -               end
38 -               if col<s(2), break, end
39 -           end
40 -           Con1 = bwtraceboundary(cur_img,[row col], 'W');
41
42 -           if isempty(Con1)
43 -               for row = 1:s(1)
44 -                   for col = 1:s(2)
45 -                       if cur_img(row,col)
46 -                           break
47 -                       end
48 -                   end
49 -                   if col<s(2), break, end
50 -               end
```

```

51 -         | Con1 = bwtraceboundary(cur_img,[row col],'W');
52 -         end
53 -
54 -         Con2 = Con1';
55 -         Con3 = Con2(2,:) ; Con3(2,:) = Con2(1,:);
56 -         contour{j} = Con3;
57 -         w_size(j) = f_s(u(j));
58 -     end
59 -
60 -     TRC.contour{index} = contour;
61 -     TRC.centroid{index} = centroids;
62 -     TRC.fr_num{index} = fr_num;
63 -     TRC.time{index} = T_1;
64 -     TRC.size{index} = w_size;
65 -
66 -     if make_pic
67 -         Pics{1,index} = img;
68 -         Pics{2,index} = cur_img;
69 -         Pics{3,index} = contour;
70 -         Pics{4,index} = centroids;
71 -         Pics{5,index} = w_size;
72 -         Pics{6,index} = T_1;
73 -     end
74 - end
75 -
76 - set(gcf,'doublebuffer','on')
77 - imagesc(img), colormap(gray), hold on
78 - if isempty(contour{1})
79 -     hold off
80 - else
81 -     for k = 1:size(contour,2)
82 -         x1 = contour{k}; y1 = centroids(:,k);
83 -         plot(x1(1,:),x1(2:,:), 'green','LineWidth',3), hold on
84 -         plot(y1(1),y1(2), 'blueo','MarkerFaceColor','blue'), hold off
85 -     end
86 - end
87 -
88 - if index == 0
89 -     q = 0;
90 - else
91 -     q = round(TRC.time{index}/60);
92 - end
93 -
94 - title([horzcat('Zeit: ', num2str(round(toc/60)), ' min');...
95 - horzcat('Frames: ', num2str(fr_num));...
96 - horzcat('Frames getrackt: ', num2str(index),...
97 - ' letzter Track bei : ', num2str(q), ' min')})
98 -
99 -
100 - if toc/60 >= T_max

```

```
101 -         st_trc = 1;  
102 -     else  
103 -         st_trc = 0;  
104 -     end
```

Aufnahme-Verfahren II

```

1 - make_pic = 1;
2
3 - if fr_num == 0
4 -     Pics = {};
5 - end
6
7 - if fpt_ctrl == 0
8 -     q_fpt = 1;
9 - else
10 -     q_fpt = fpt;
11 - end
12
13 - if q_fpt < 1
14 -     q_fpt = 1;
15 - end
16 - set(vid, 'FramesPerTrigger', q_fpt)
17
18 - T_0 = toc;
19 - start(vid)
20 - pause(.1)
21 - data = getdata(vid);
22
23 - pause(.1)
24 - stop(vid)
25 - T_1 = toc;
26
27 - for ii = 1:q_fpt
28 -     fpt_ctrl = 0;
29 -     fr_num = fr_num + 1;
30 -     img = double(data(:, :, ii));
31
32 -     thres_img = img <= th_s;
33 -     border_img = imclearborder(thres_img);
34
35 -     CC = bwconncomp(border_img);
36 -     stats = regionprops(CC, 'Area');
37 -     f_s = [stats.Area];
38 -     u = find(f_s >= m_size_s);
39 -     centroids = zeros(2,1); contour = {}; w_size = zeros(1,1);
40
41 -     if ~isempty(u)
42 -         index = index+1; fpt_ctrl = 1;
43 -         for j = 1:size(u,2)
44 -             cur_img = ismember(labelmatrix(CC), u(j));
45 -             Cen = regionprops(cur_img, 'centroid');
46 -             centroids(:,j) = Cen.Centroid;
47
48 -             s = size(cur_img);
49 -             for row = 1:50:s(1)
50 -                 for col = 1:s(2)

```



```

51 -         if cur_img(row,col)
52 -             break
53 -         end
54 -     end
55 -     if col<s(2), break, end
56 - end
57 - Con1 = bwtraceboundary(cur_img,[row col],'W');
58 - if isempty(Con1)
59 -     s = size(cur_img);
60 -     for row = 1:s(1)
61 -         for col = 1:s(2)
62 -             if cur_img(row,col)
63 -                 break
64 -             end
65 -         end
66 -         if col<s(2), break, end
67 -     end
68 -     Con1 = bwtraceboundary(cur_img,[row col],'W');
69 - end
70 - Con2 = Con1';
71 - Con3 = Con2(2,:) ; Con3(2,:) = Con2(1,:);
72 - contour{j} = Con3;
73 - w_size(j) = f_s(u(j));
74 - end
75 -
76 - TRC.contour{index} = contour;
77 - TRC.centroid{index} = centroids;
78 - TRC.fr_num{index} = fr_num;
79 - TRC.time{index} = T_0+(ii/q_fpt)*(T_1-T_0);
80 - TRC.size{index} = w_size;
81 -
82 - if make_pic
83 -     if index < 250
84 -         Pics{1,index} = img;
85 -         Pics{2,index} = cur_img;
86 -         Pics{3,index} = contour;
87 -         Pics{4,index} = centroids;
88 -         Pics{5,index} = w_size;
89 -         Pics{6,index} = T_0+(ii/q_fpt)*(T_1-T_0);
90 -     end
91 - end
92 -
93 - end
94 - end
95 -
96 -
97 - set(gcf,'doublebuffer','on')
98 - imagesc(img), colormap(gray), hold on
99 - if isempty(u)
100 -     hold off

```

```

101 -     else
102 -         for k = 1:size(contour,2)
103 -             x1 = contour{k}; y1 = centroids(:,k);
104 -             plot(x1(1,:),x1(2:,:), 'green', 'LineWidth',3), hold on
105 -             plot(y1(1),y1(2), 'blueo', 'MarkerFaceColor', 'blue'), hold on
106 -         end
107 -     hold off
108 - end
109
110 - if index > 0
111 -     title([horzcat('Zeit: ', num2str(round(toc/60)), ' min');...
112 -     horzcat('Frames: ', num2str(fr_num));...
113 -     horzcat('Frames getrackt: ', num2str(index), ...
114 -     '    letzter Track bei : ', num2str(round(TRC.time{index}/60)), ' min')])
115 - else
116 -     title([horzcat('Zeit: ', num2str(round(toc/60)), ' min');...
117 -     horzcat('Frames: ', num2str(fr_num));...
118 -     horzcat('Frames getrackt: ', num2str(index), ...
119 -     '    letzter Track bei : ', 'noch kein Frame getrackt')])
120 -
121 - end
122
123 - if toc/60 >= T_max
124 -     st_trc = 1;
125 - else
126 -     st_trc = 0;
127 - end

```

Aufnahme-Verfahren III

```
1 |
2 % Initialisierung
3 - if kk== 0
4 -     make_pic = 1;
5 -     Pics = {[]};
6
7 -     closepreview(vid), index = 0; idx = [];
8 -     F_Size_ges = zeros(1,1); pre_ctrl = 0;
9 -     counter_x = 0; counter_y = 0; save_ctrl = 0;
10 -     tr_num = size(TRC.contour,2) +1; tic; abc = 0;
11
12 -     TRC.einstellungen.framespertrigger{tr_num} = fpt;
13 -     TRC.einstellungen.exposuretime{tr_num} = bz_s;
14 -     TRC.einstellungen.threshold{tr_num} = th_s;
15 -     TRC.einstellungen.fill_ctrl{tr_num} = fill_ctrl;
16 -     TRC.einstellungen.filter1{tr_num} = filt1_ctrl;
17 -     TRC.einstellungen.Maskel{tr_num} = m1_size_s;
18 -     TRC.einstellungen.filter2{tr_num} = filt2_ctrl;
19 -     TRC.einstellungen.Maske2{tr_num} = m2_size_s;
20 -     TRC.einstellungen.filter3{tr_num} = filt3_ctrl;
21 -     TRC.einstellungen.Maske3{tr_num} = m3_size_s;
22 - end
23
24 - if pre_ctrl
25 -     closepreview(vid)
26 - end
27
28
29 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
30
31 % ROI - Position
32 - if isempty(idx) || counter_x && counter_y || pre_ctrl
33 -     coor = [0 0 1624 1234]; rect = coor;
34 - elseif counter_x <= 0 && counter_y <= 0
35 -     coor_0 = rect(1:2); coor = coor_0+Box(1:2);
36 -     rect = [coor(1)-cage coor(2)-cage Box(3)+2*cage Box(4)+2*cage];
37 - elseif counter_x > 0
38 -     coor_0 = rect(1:2); coor = coor_0 + Box(1:2);
39 -     rect = [0 coor(2)-cage 1624 Box(4)+2*cage];
40 - elseif counter_y > 0
41 -     coor_0 = rect(1:2); coor = coor_0 + Box(1:2);
42 -     rect = [coor(1)-cage 0 Box(3)+2*cage 1234];
43 - end
44
45 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
46 % Stage fahren
47
48 - mov_x = 0;
49 - if rect(1) <0, mov_x = 2; rect(1) = 0; end
50 - if rect(1)+rect(3) > 1624, mov_x = 1; rect(3) = 1624 -rect(1); end
```

```

51 |
52 - mov_y = 0;
53 - if rect(2) < 0, mov_y = 1; rect(2) = 0; end
54 - if rect(2)+rect(4) > 1234, mov_y = 2; rect(4) = 1234 -rect(2); end
55
56 - if mov_x, counter_x = 2;
57 - elseif counter_x && ~mov_x, counter_x = counter_x -1;
58 - end
59
60 - if mov_y, counter_y = 2;
61 - elseif counter_y && ~mov_y, counter_y = counter_y -1;
62 - end
63
64 - mov_x = 0; mov_y = 0;      % Stage fährt nicht
65
66 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
67
68 - if fpt <= 0 || isempty(idx) || pre_ctrl || thres_plot
69 -     fpt = 1;
70 - end
71
72 - set(vid,'FramesPerTrigger',fpt);
73 - set(vid,'ROIPosition',rect);
74
75 - start(vid),
76 - data = getdata(vid);
77 - stop(vid)
78
79 - if pre_ctrl
80 -     pre_ctrl = 0;
81 - end
82
83 %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
84
85 - for ii = 1:fpt
86 -     img = double(data(:,:,ii)); abc = abc +1; TT = toc;
87
88 -     if filtrl_ctrl == 0
89 -         filtrl_img = img;
90 -     elseif filtrl_ctrl == 1
91 -         Mask1 = fspecial('average',[ml_size_s ml_size_s]);
92 -         filtrl_img = imfilter(img,Mask1,'replicate');
93 -     elseif filtrl_ctrl == 2
94 -         Mask1 = fspecial('disk',ml_size_s);
95 -         filtrl_img = imfilter(img,Mask1,'replicate');
96 -     elseif filtrl_ctrl == 3
97 -         Mask1 = fspecial('gaussian',[ml_size_s ml_size_s]);
98 -         filtrl_img = imfilter(img,Mask1,'replicate');
99 -     elseif filtrl_ctrl == 4
100 -         Mask1 = fspecial('laplacian');

```

```

101 -         filt1_img = imfilter(img,Mask1,'replicate');
102 -     elseif filt1_ctrl == 5
103 -         Mask1 = fspecial('log',[m1_size_s m1_size_s]);
104 -         filt1_img = imfilter(img,Mask1,'replicate');
105 -     elseif filt1_ctrl == 6
106 -         Mask1 = strel('diamond',m1_size_s);
107 -         filt1_img = imdilate(img,Mask1);
108 -     elseif filt1_ctrl == 7
109 -         Mask1 = strel('diamond',m1_size_s);
110 -         filt1_img = imerode(img,Mask1);
111 -     elseif filt1_ctrl == 8
112 -         Mask1 = strel('diamond',m1_size_s);
113 -         filt1_img = imopen(img,Mask1);
114 -     elseif filt1_ctrl == 9
115 -         Mask1 = strel('diamond',m1_size_s);
116 -         filt1_img = imclose(img,Mask2);
117 -     else
118 -         filt1_img = wiener2(img,[m1_size_s m1_size_s]);
119 -     end
120 -
121 -
122 -     if filt2_ctrl == 0
123 -         filt2_img = filt1_img;
124 -     elseif filt2_ctrl == 1
125 -         Mask2 = fspecial('average',[m2_size_s m2_size_s]);
126 -         filt2_img = imfilter(filt1_img,Mask2,'replicate');
127 -     elseif filt2_ctrl == 2
128 -         Mask2 = fspecial('disk',m2_size_s);
129 -         filt2_img = imfilter(filt1_img,Mask2,'replicate');
130 -     elseif filt2_ctrl == 3
131 -         Mask2 = fspecial('gaussian',[m2_size_s m2_size_s]);
132 -         filt2_img = imfilter(filt1_img,Mask2,'replicate');
133 -     elseif filt2_ctrl == 4
134 -         Mask2 = fspecial('laplacian');
135 -         filt2_img = imfilter(filt1_img,Mask2,'replicate');
136 -     elseif filt2_ctrl == 5
137 -         Mask2 = fspecial('log',[m2_size_s m2_size_s]);
138 -         filt2_img = imfilter(filt1_img,Mask2,'replicate');
139 -     elseif filt2_ctrl == 6
140 -         Mask2 = strel('diamond',m2_size_s);
141 -         filt2_img = imdilate(filt1_img,Mask2);
142 -     elseif filt2_ctrl == 7
143 -         Mask2 = strel('diamond',m2_size_s);
144 -         filt2_img = imerode(filt1_img,Mask2);
145 -     elseif filt2_ctrl == 8
146 -         Mask2 = strel('diamond',m2_size_s);
147 -         filt2_img = imopen(filt1_img,Mask2);
148 -     elseif filt2_ctrl == 9
149 -         Mask2 = strel('diamond',m2_size_s);
150 -         filt2_img = imclose(filt1_img,Mask2);

```

```

151 -     else
152 -         filt2_img = wiener2(filt1_img, [m2_size_s m2_size_s]);
153 -     end
154 -
155 -
156 -     if thres_ctrl == 0
157 -         thres_img = filt2_img <= th_s;
158 -     else
159 -         thres_img = filt2_img > th_s;
160 -     end
161 -
162 -
163 -     if filt3_ctrl == 0
164 -         filt3_img = thres_img;
165 -     elseif filt3_ctrl == 1
166 -         Mask3 = fspecial('average', [m3_size_s m3_size_s]);
167 -         filt3_img = imfilter(thres_img, Mask3, 'replicate');
168 -     elseif filt3_ctrl == 2
169 -         Mask3 = fspecial('disk', m3_size_s);
170 -         filt3_img = imfilter(thres_img, Mask3, 'replicate');
171 -     elseif filt3_ctrl == 3
172 -         Mask3 = fspecial('gaussian', [m3_size_s m3_size_s]);
173 -         filt3_img = imfilter(thres_img, Mask3, 'replicate');
174 -     elseif filt3_ctrl == 4
175 -         Mask3 = fspecial('laplacian');
176 -         filt3_img = imfilter(thres_img, Mask3, 'replicate');
177 -     elseif filt3_ctrl == 5
178 -         Mask3 = fspecial('log', [m3_size_s m3_size_s]);
179 -         filt3_img = imfilter(thres_img, Mask3, 'replicate');
180 -     elseif filt3_ctrl == 6
181 -         Mask3 = strel('diamond', m3_size_s);
182 -         filt3_img = imdilate(thres_img, Mask3);
183 -     elseif filt2_ctrl == 7
184 -         Mask3 = strel('diamond', m3_size_s);
185 -         filt3_img = imerode(thres_img, Mask3);
186 -     elseif filt2_ctrl == 8
187 -         Mask3 = strel('diamond', m3_size_s);
188 -         filt3_img = imopen(thres_img, Mask3);
189 -     elseif filt3_ctrl == 9
190 -         Mask3 = strel('diamond', m3_size_s);
191 -         filt3_img = imclose(thres_img, Mask3);
192 -     else
193 -         filt3_img = wiener2(thres_img, [m3_size_s m3_size_s]);
194 -     end
195 -
196 -     border_img = imclearborder(filt3_img);
197 -
198 -     if fill_ctrl == 0
199 -         fill_img = imfill(border_img, 'holes');
200 -     else

```

```

201 - | fill_img = border_img;
202 - end
203
204 - cc = bwconncomp(fill_img);
205 - stats = regionprops(cc, 'Area', 'BoundingBox', 'Centroid');
206
207 - if kk == 0
208 -     [F_Size,idx] = max([stats.Area]);
209 - else
210 -     [Q,idx] = min(abs([stats.Area]-W_Size));
211 -     F_Size = [stats.Area]; F_Size = F_Size(idx);
212 -     if Q/W_Size > max_diff
213 -         idx = [];
214 -     end
215 - end
216
217 - %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
218 - % Wurm identifizieren
219
220 - if ~isempty(idx)
221 -     Box = [stats.BoundingBox]; Box = Box(4*idx-3:4*idx);
222 -     xs = [stats.Centroid]; xs = xs(2*idx-1:2*idx);
223 -     find_img = ismember(labelmatrix(cc),idx);
224
225 - %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
226 - % Rand auslesen
227
228 -     s = size(find_img);
229 -     for row = 1:50:s(1)
230 -         for col = 1:s(2), if find_img(row,col), break, end, end
231 -         if col<s(2), break, end
232 -     end
233 -     x = bwtraceboundary(find_img,[row col],'W');
234
235 -     if isempty(x)
236 -         for row = 1:1:s(1)
237 -             for col = 1:s(2), if find_img(row,col), break, end, end
238 -             if col<s(2), break, end
239 -         end
240 -         x = bwtraceboundary(find_img,[row col],'W');
241 -     end
242
243 - %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
244 - % Speichern
245 -     index = index+1;
246 -     F_Size_ges(index) = F_Size; W_Size = mean(F_Size_ges);
247
248 -     contour_x = x(:,1) + rect(2);
249 -     contour_y = x(:,2) + rect(1);
250 -     contour_xy = [contour_x,contour_y];

```

```

251 - position_xy = [position_x,position_y];
252 - center_of_mass = xs +rect(1:2);
253
254 - TRC.contour{index,tr_num} = contour_xy;
255 - TRC.centroid{index,tr_num} = center_of_mass;
256 - TRC.size{index,tr_num} = F_Size;
257 - TRC.length{index,tr_num} = size(x,1);
258 - TRC.time{index,tr_num} = TT;
259 - TRC.fr_num{index,tr_num} = abc;
260 - TRC.stage_position{index,tr_num} = position_xy;
261
262 - if make_pic
263 -     Pics{1,index} = img;
264 -     Pics{2,index} = fill_img;
265 -     Z = [Box(1)+rect(1), Box(2)+rect(2) ,Box(3), Box(4) ];
266 -     Pics{3,index} = Z;
267 -     Pics{4,index} = rect;
268 -     Pics{5,index} = contour_xy;
269 -     Pics{6,index} = center_of_mass;
270 -     Pics{7,index} = F_Size;
271 -     Pics{8,index} = abc;
272 - end
273
274 - if index >= packet_size
275 -     tr_num = tr_num+1; index = 0;
276 - end
277
278 - end
279 =====
280
281
282
283 %Plotten
284 - if ii == fpt
285 -     if thres_plot
286 -         figure(1)
287 -         set(gcf,'doublebuffer','on')
288 -         imagesc(thres_img)
289 -     else
290
291 -         figure(1)
292 -         set(gcf,'doublebuffer','on')
293
294 -         imagesc(img), colormap(gray), hold on
295 -         if ~isempty(idx)
296 -             plot(x(:,2),x(:,1),'green','LineWidth',2), hold on
297 -             plot(xs(1),xs(2),'blueo','MarkerFaceColor',...
298 -                 'red','MarkerSize',12), hold off
299 -         else
300 -             hold off

```



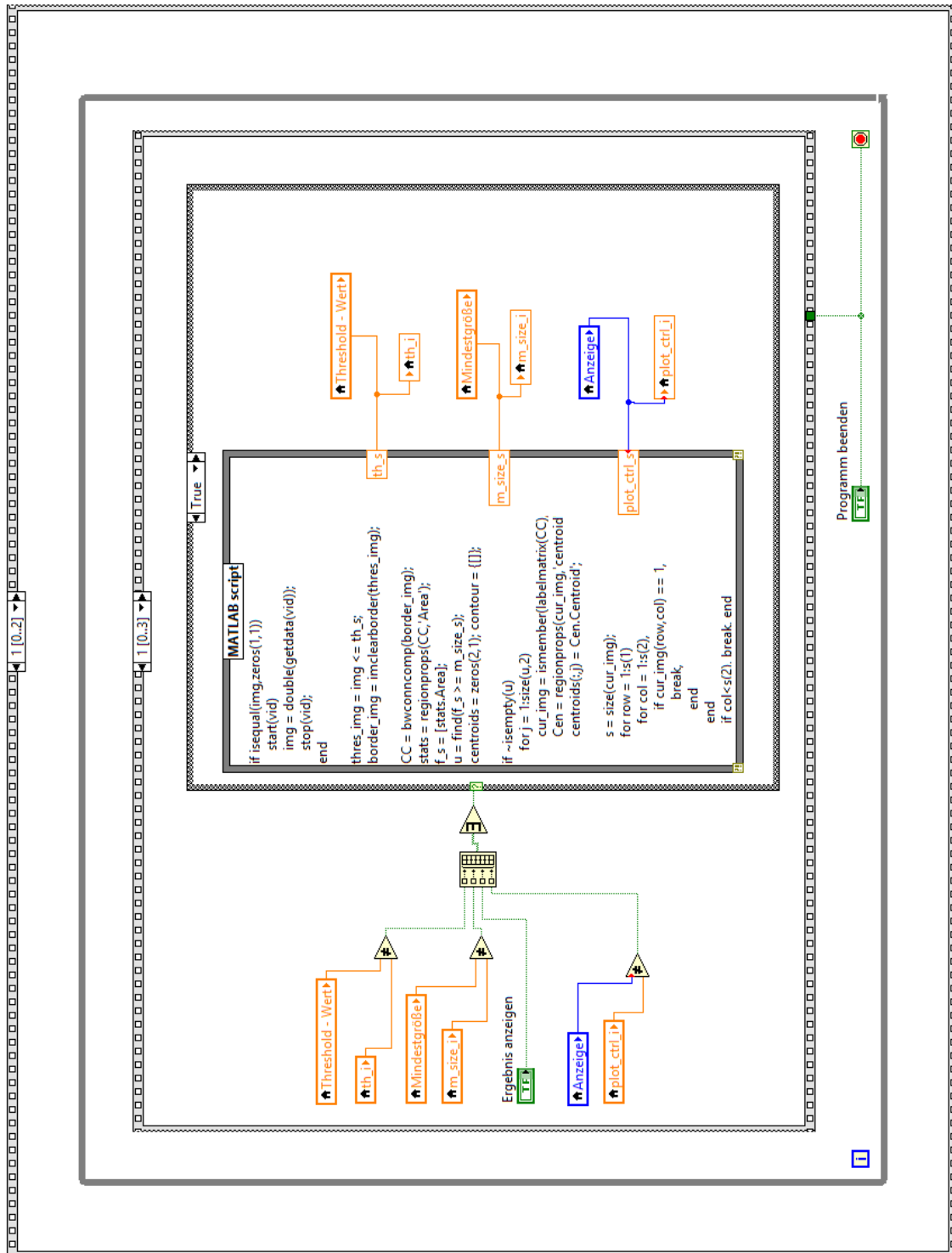
```

301 -         end
302 -     end
303 -     title({horzcat('Frame: ', num2str(index));...
304 -           horzcat('Packet: ', num2str(tr_num));...
305 -           horzcat('Zeit/[min]: ', num2str(round(toc/60)));...
306 -           horzcat('Frames per Trigger: ', num2str(fpt))})
307 -     end
308 -
309 - end
310
311

```

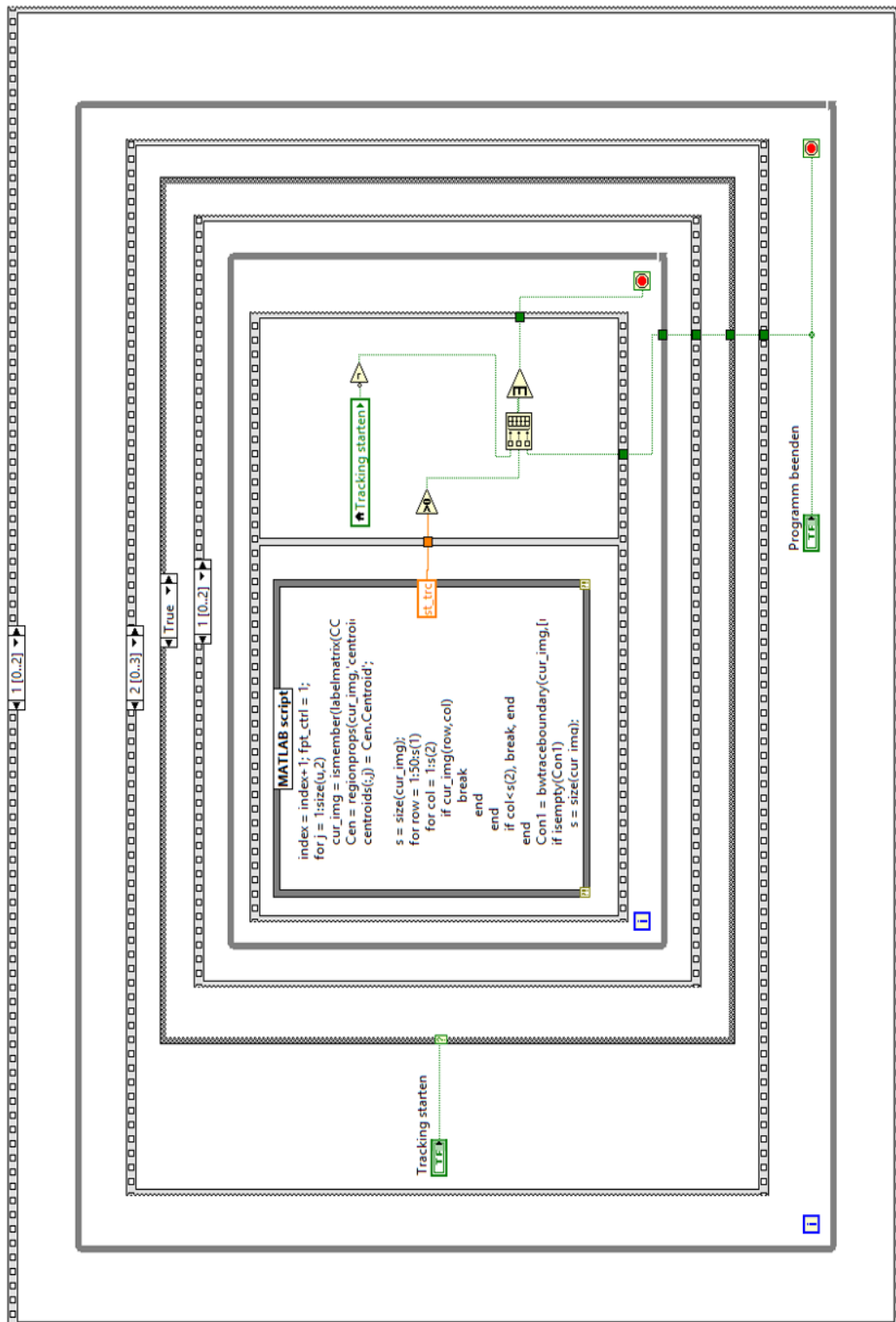
Blockschaltbilder

Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren I



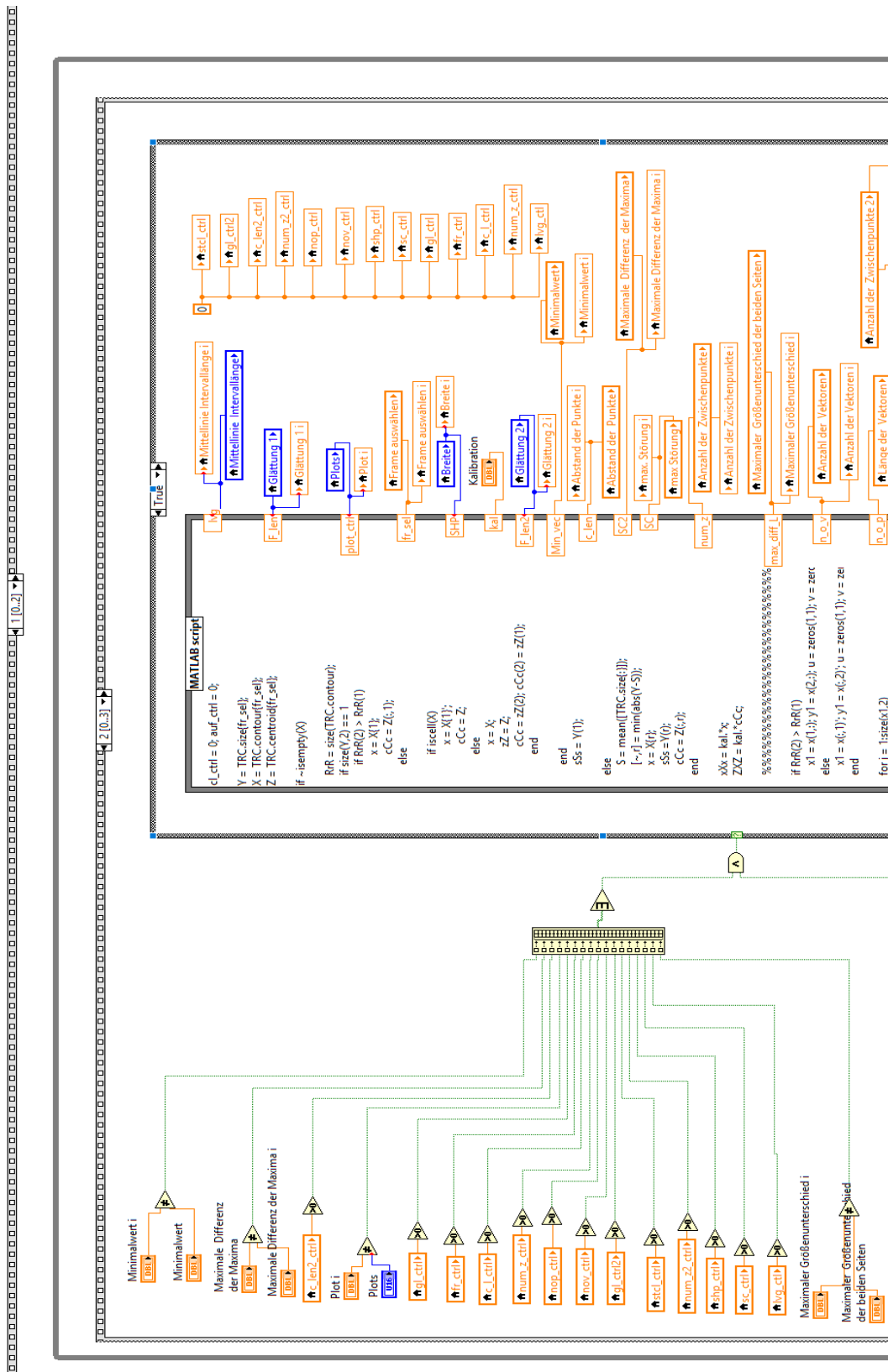
Blockschaltbild (bzw. der Rahmen zum Suchen der benötigten Einstellungen) des Aufnahme-Verfahrens I. Mit dem verwendeten Software-Konzept können Matlab (Kasten mittig im Bild) und LabVIEW miteinander verknüpft werden. Damit lassen sich die Vorteile der beiden Programme kombinieren. Da bei jedem Durchlauf der while-Schleife die Soll- und Istwerte der Parameter (z. B. Schwellwert, Mindestgröße, ...) miteinander verglichen werden, erkennt die Software jede Änderung der GUI-Einstellungen. Sobald eine Einstellung an der GUI geändert wird, wird das Matlab-Skript automatisch (einmal) ausgeführt und das Resultat sofort in einem aktualisiertem (Echtzeit-)Plot angezeigt. (Ein einfaches Programmierbeispiel befindet sich im Kapitel 4.4. und die Matlab-Skripte der Tracking-Programme befinden sich im Anhang.)

Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren II



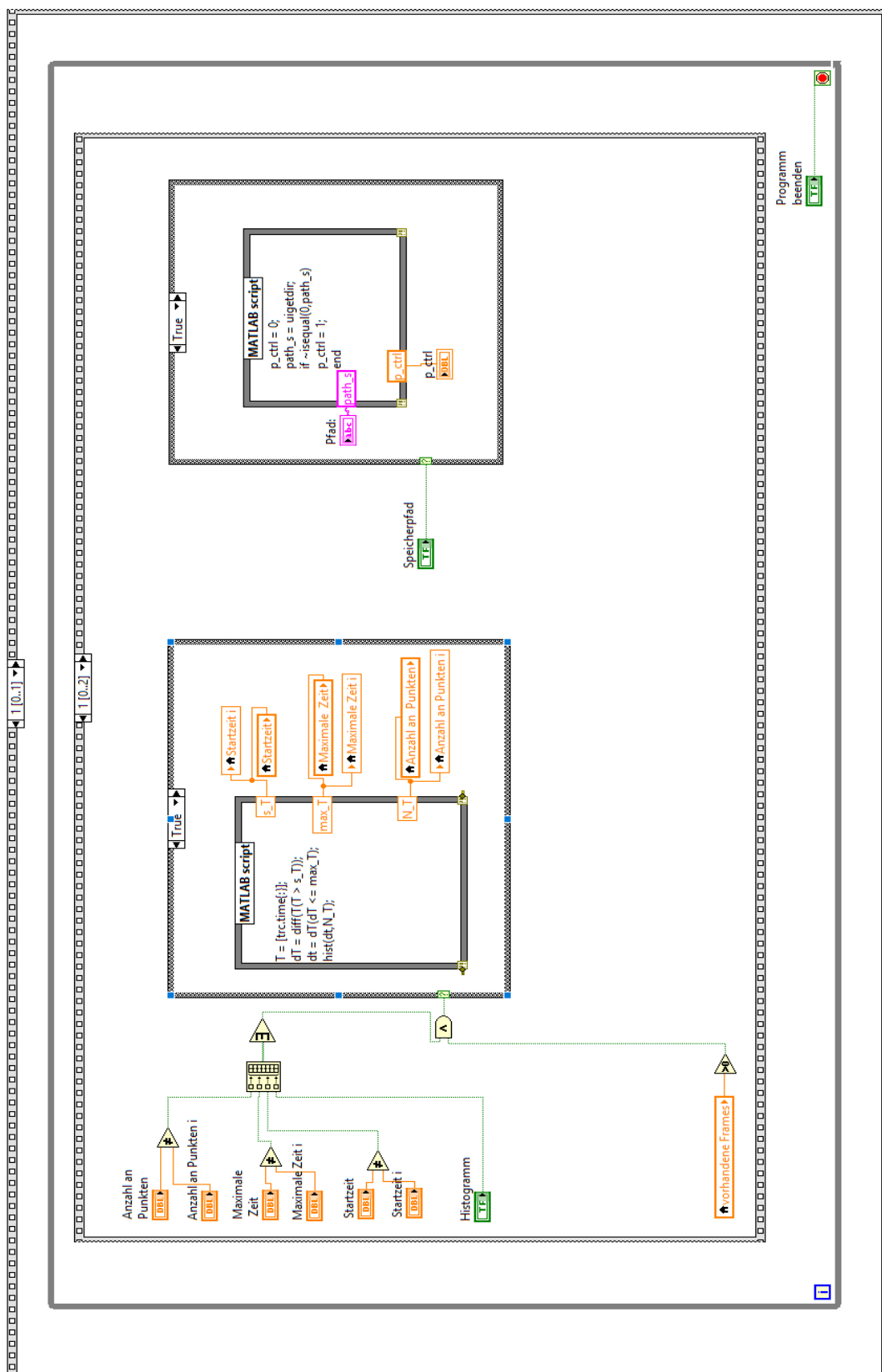
Blockschaltbild des Aufnahme-Verfahren II. In der Abbildung ist derjenige Rahmen des Tracking-Programms gezeigt, in dem der Tracking-Algorithmus ausgeführt wird. Die innenliegende while-Schleife, die während der Messung immer wieder durchlaufen wird, wird erst beendet, wenn die eingestellte Messzeit abgelaufen ist, der Button 'Tracking beenden' gedrückt wird oder das Programm beendet wird. (Das Matlab Skript des Tracking-Algorithmus befindet sich ebenfalls im Anhang)

Blockschaltbild der Qualitätskontrolle



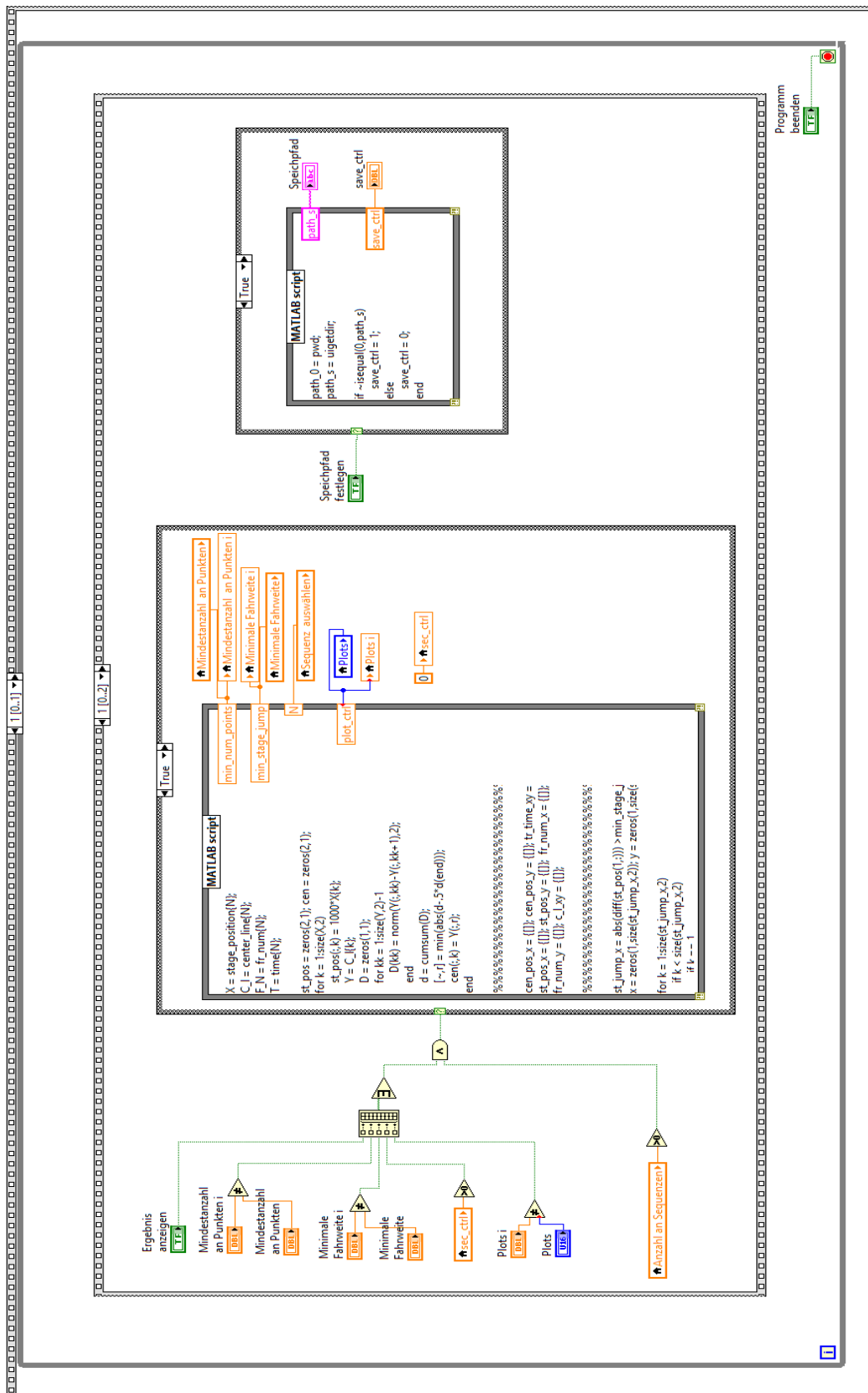
Ausschnitt aus dem Blockschaltbild der 'Qualitätskontrolle'. Zu sehen ist der Rahmen, in dem die gemachten Einstellungen auf ein (Test-)Objekt angewandt werden. Wie in der Abbildung gut zu erkennen ist, besitzt jeder Parameter (z. B. '*Minimalwert*') einen Soll- und Istwert. Damit erkennt die Software, ob sich eine GUI-Einstellung geändert hat. Jedes Mal, wenn sich eine GUI-Einstellung ändert, wird das Matlab-Skript (Kasten mittig im Bild) genau einmal ausgeführt und das Ergebnis in einem (Echtzeit-)Plot angezeigt.

Blockschaltbild der Segmentierung



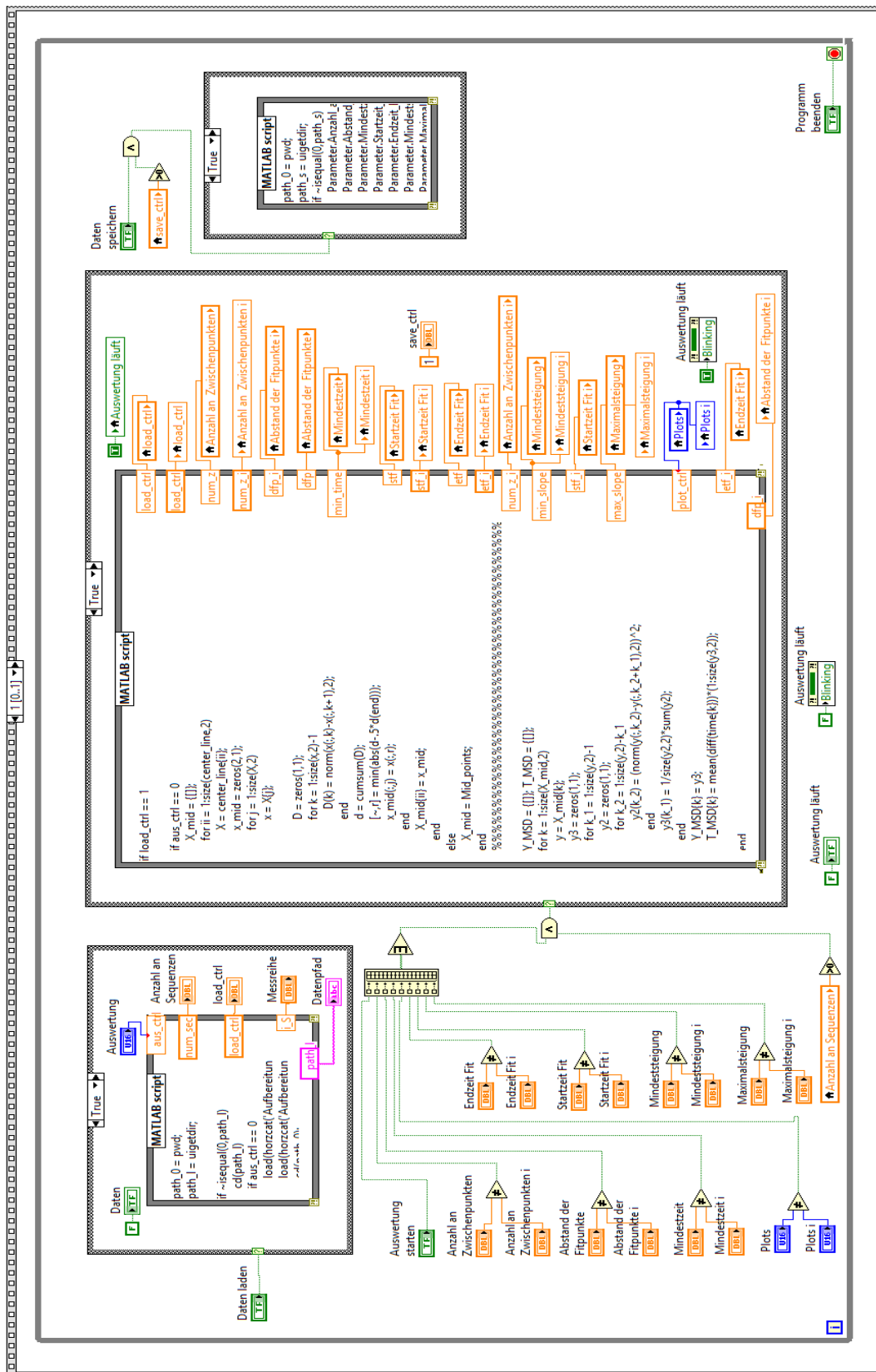
Blockschaltbild des Programms 'Segmentierung'. In der Abbildung ist derjenige Rahmen gezeigt, in dem die GUI-Einstellungen 'Startzeit', 'Maximale Zeit' und 'Anzahl an Punkten' verarbeitet werden (Kasten links). Auch die Programmierung des Buttons 'Speicherpfad', mit dem der Speicherort der Tracking-Sequenzen festgelegt wird (Kasten rechte Seite), ist im Blockschaltbild zu sehen.

Blockschaltbild für die Bestimmung der absoluten Nematoden-Position



Blockschaltbild des Programms 'absolute Nematoden-Position'. In der Abbildung ist der Rahmen des Blockschaltbilds gezeigt, in dem die (Kontroll-)Einstellungen verarbeitet werden. Jedes Mal, wenn eine GUI-Einstellung geändert wird, wird das Matlab-Skript (grauer Kasten in der Mitte) einmal ausgeführt. Auf der rechten Seite ist die Programmierung des Buttons '*Speicherpfad festlegen*' zu sehen.

Blockschaltbild des Programms zur Bewegungskontrolle



Blockschaltbild des Hauptrahmens der 'Bewegungskontrolle'. Jeder Parameter, der an der GUI eingestellt werden kann, besitzt einen Soll- und Istwert. Damit erkennt das Programm, ob eine GUI-Einstellung geändert wurde. Jedes Mal, wenn sich eine GUI-Einstellung ändert, wird das Matlab-Skript (Kasten in der Mitte) genau einmal ausgeführt. Im Blockschaltbild ist auch die Programmierung der Button 'Daten laden' (Kasten oben links) und 'Daten speichern' (Kasten oben rechts) zu sehen.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Bayreuth, den

.....
Unterschrift